

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY

Managing Director
Chief Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

ALMEIDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)
CHEN Y. (Chine / *China*)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
GUO X. (Chine / *China*)
HE K. (Chine / *China*)
IATROU K. (Grèce / *Greece*)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
KUSAKABE T. (Japon / *Japan*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
MACHII H. (Japon / *Japan*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MASE K. (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. (Allemagne / *Germany*)
TZENOV P. (Bulgarie / *Bulgaria*)
VAGO C. (France)
XIA Q. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YUNGEN M. (Chine / *China*)

NUTRITIONAL ASPECTS AND SURVIVAL IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*, L. – A NEW PERSPECTIVE

M. V. CHANDRAKALA, V. G. MARIBASHETTY, C. S. GURURAJ, PRAKASH DHARANI & B. M. SEKHARAPPA

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

*Nutritional aspects are an important consideration for the survival of the silkworm. ultimately, deciding the success of cocoon crops. Even as it has adapted to the nutritional status of its natural feed, the mulberry leaf for its growth and development, the silkworm, **Bombyx mori** L. encounters various constraints like attack from pathogens in the environment and accumulation of toxic phytochemicals from the feed itself. However, it has developed various strategies, both mechanical and chemical processes to overcome these limitations, which can be effectively utilized to manipulate its survival during adverse environmental conditions during rearing. Supplementation of some important nutrients/factors is one valuable strategy to increase the disease tolerance for better survival of the silkworm.*

Keywords: *Bombyx mori*, nutrition, survival, nutrient supplementation.

INTRODUCTION

The adoption of new technologies like raising high yielding mulberry varieties, rearing of improved silkworm cross breeds, regular use of bed disinfectants, improved rearing techniques, etc., has brought in a paradigm shift in the cocoon yield pattern obtained by the silkworm rearers in India towards higher productivity in recent years. But the problems of low yield during unfavorable seasons/conditions still persist because of crop losses mainly due to silkworm diseases. Bivoltine silkworm rearing, in particular, is a difficult task under tropical conditions and one of the major reasons attributed to this is poor nutritional quality of mulberry leaves (Dandin *et al.*, 2003). Though the optimum environmental conditions can be maintained inside the rearing house, the quality of mulberry leaf cannot be as expected, even by providing optimum agronomical inputs, because of high temperature and low humidity conditions. One of the solutions to this problem is breeding stress/disease tolerant races, but they are invariably associated with low productivity (Akio, 1995) and selection of tolerant strains is rather time consuming. A suitable alternative is supplementing leaves with factors that build disease/stress tolerance in silkworm larvae in order to obtain higher cocoon yield, irrespective of season/adverse conditions. But before attempting to develop supplements, understanding of the complex factors involved in nutrition and health is a prerequisite. An ample number of reports on insect-plant interactions, accumulated over the past decade, suggests that, apart from the major nutrients, phytochemicals like phenolics, alkaloids, tannins, flavonoids play a decisive role in the defense mechanism of phytophagous insects (Smith, 1989; Hoover *et al.*, 1998). The phenolic compounds are reported to have multiple biological effects, including antioxidant activity by retarding oxidative degradation of lipids and thereby improving the quality and nutritional value of food. However, some of these chemicals do have toxic effect, hence insects have evolved

various detoxification mechanisms to overcome this hurdle. These findings suggest that phytochemicals have an important role in preventing infections and due to their anti-oxidant activity, build up robustness. This information is essential before developing an effective nutrient supplement to enhance the survival of silkworms. An attempt is made in this article to sum up the recent information on the nutrients and phytochemicals influencing the health of insects with special reference to silkworms.

DEFENSE SYSTEM IN SILKWORMS

Phytophagous insects have evolved various strategies to adapt either to a single plant (monophagous) or a group of plants (polyphagous) to derive the required nutrients. During feeding they are also exposed to harmful chemicals present in the host plant itself, such as, several secondary metabolites. Consequently, these insects have to protect themselves from the following threats during their life: i) abrasive food, ii) toxic phytochemicals and iii) invasive pathogens (Barbehenn and Stannard, 2004) (Fig.1). The silkworm, *Bombyx mori*, L. a monophagous lepidopteran, feeds and utilizes nutrients from mulberry leaves for its growth and development. Hence, it is expected that the silkworm like other lepidopterans has adapted effectively to the presence of secondary metabolites obtained from mulberry, by evolving various mechanisms to utilize these chemicals to protect itself against the accumulation of toxins and pathogens. The silkworm is healthy if it is not challenged by pathogens or it should be strong enough to fight against the infection in the presence of pathogens. Though they are definitely related, the exact dietary requirements and their interactions with physiological and pathological factors, involved in making the silkworms robust, however, have not been resolved clearly.

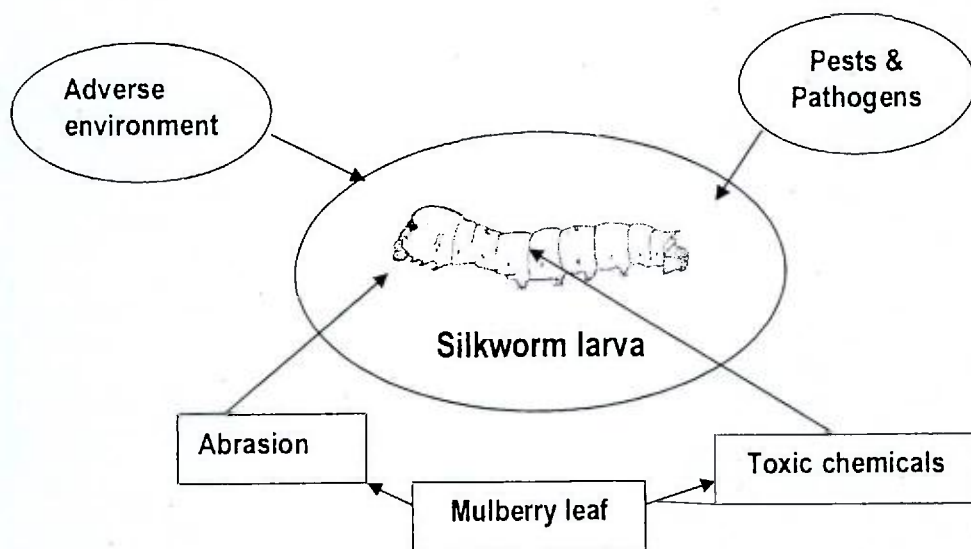


Fig. 1. Threats to silkworm health.

Fig. 1. Menaces pour la santé du ver à soie.

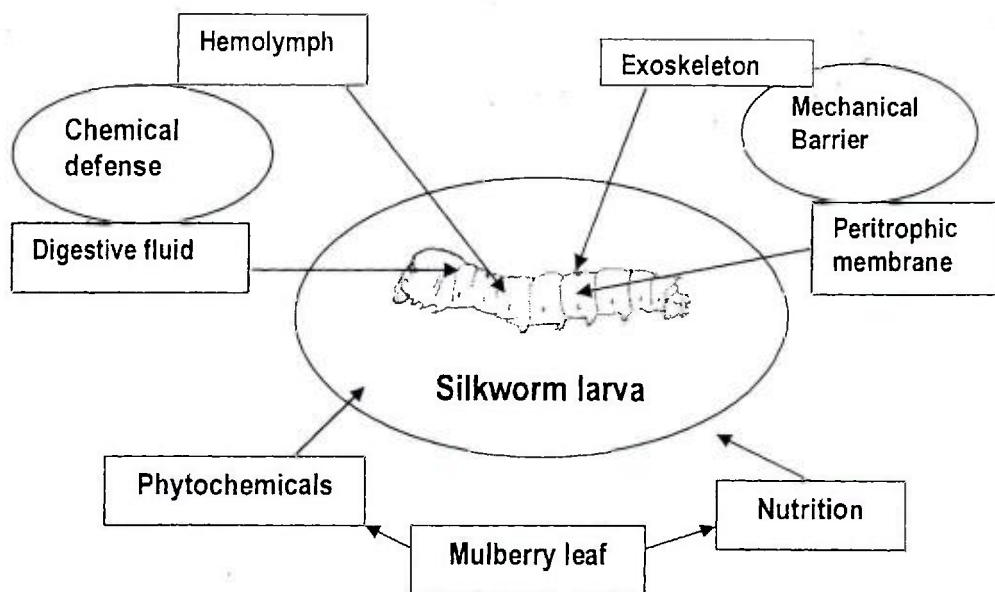


Fig. 2. Protection mechanism in silkworms.

Fig. 2. Mécanisme de protection chez les vers à soie.

Silkworm rearing on artificial diet under aseptic conditions to decrease disease incidence and exact doses of antibiotics to be added have been standardized. However, artificial diet is not popular in India due to the high cost involved. Rearing on mulberry leaves exposes the silkworm larvae to numerous challenges from pathogens more so, under tropical conditions. Silkworm has developed a kind of innate immunity like other phytophagous insects, by resorting to various mechanisms (Fig.2). To put it briefly, the defense mechanism in general, involves:

- i) Exoskeleton
- ii) Midgut:
 - a. Peritrophic membrane
 - b. Digestive fluid/enzymes
- iii) Hemolymph:
 - a. Cellular
 - b. Humoral

The mechanical barriers from the invasive pathogens include the exoskeleton i.e., the cuticle and peritrophic membrane that lines the digestive system. The cuticle provides a physical barrier against the pathogens in the environment and water loss from the body. The existence of a pro-phenoloxidase enzyme in the cuticle (which is transported from the hemolymph) indicates that it participates actively in the defense system whenever an injury to the skin occurs (Asano and Ashida, 2001). The peritrophic membrane provides an effective mechanical barrier against the abrasive margins of cut leaves,

protecting the underlying epithelial layer of the gut. In addition, it is reported to have a multiple role in defending the insect like i) adsorption, ii) ultrafiltration, iii) polyanion exclusion of ingested toxic phytochemicals and iv) anti-oxidant activity against the free radicals produced from metabolic activities (Barbehenn, 2001).

The alkaline pH of digestive juice and some of the digestive enzymes have anti-viral and anti-bacterial effect. Presence of several low molecular antibacterial substances is reported in the digestive juice of silkworms (Hayashiya, 1978; Izuka, 1985;). Insects are known to possess a rapidly responsive innate immune system, which is well adapted to their short life span. Insect immunity consists of cellular and humoral reactions. Cellular reactions involve phagocytosis, nodule formation and encapsulation by plasmatocytes and granulocytes. On the other hand, humoral reactions involve the pro-phenol oxidase enzyme-activating cascade and immune proteins such as lysozymes, lectins, antibacterial proteins and antifungal proteins (Gillepie *et al.*, 1997). After the discovery of presence of bactericidal activity in cell free hemolymph reported by Kinoshita and Inoue (1977), several antiviral and antibacterial factors have been identified in the hemolymph (Hayashiya, 1978). However, the studies are yet to be initiated on the direct effect of dietary conditions on the production of antiviral and antibacterial factors.

NUTRITIVE FACTORS INVOLVED IN SURVIVAL

1. Macro and micronutrients:

The mulberry leaf is the sole food of silkworm, *Bombyx mori* L., hence the quality of leaf directly influences its survival, growth and development. The chemical composition of mulberry leaves varies with the variety, season, leaf maturity and environmental factors apart from agronomical inputs (Aruga, 1994). It is evident that all the major essential macronutrients and micronutrients influence the survival or disease resistance in the silkworm directly or indirectly (Horie, 1999). Attempt to rear silkworms on alternate plants like dandelion results in higher mortality though diseases can be controlled with the addition of antibiotics like chloramphenicol (Manchev, 1981). Nutrient quality has a direct bearing on the disease incidence of silkworm; if the nutrients are deficient in leaf during rearing then the chance of viral or bacterial diseases increases (Shantha Kumar *et al.*, 2000; Venkatesh, 2000). Water content in mulberry leaf influences ingestion, digestion and absorption of nutrients but too high content is known to affect digestion also by diluting the hemolymph; in addition, it alters pH and normal metabolic processes (Xu *et al.*, 1994). The soluble sugar content has a direct impact on the thickness of the wax layer of larval integument; higher the content in the leaf, thicker the wax layer, preventing water loss from the body. Digestion of starch content by commercial silkworm races is lower (Ito, 1978) compared to other races because of the low gut amylase enzyme activity, which in turn, is linked to the resistance factor in silkworm races (Ashwath *et al.*, 1992). It is known that under the conditions of excessive nitrogen application or less sunshine, mulberry leaves contain high nitrates and free amino acids like arginine affecting larval metabolism and increasing the susceptibility to pathogen infection (Aruga, 1994). But higher content of another amino acid, namely, aspartic acid in the leaf is known to increase ingestion in silkworms. Studies on the dietary sterol preference in the silkworm showed that β -sitosterol is most preferred followed by ergosterol, cholesterol and stigmaterol, while ergosterol had inhibitory effect on the larval growth (Nagata *et al.*, 2006).

Among vitamins, vitamin B series and vitamin C are indispensable for silkworm growth. Vitamin C is a phagostimulant, and is known to enhance the survival and cocoon yield (Madhu Babu *et al.*, 1992). Recent information suggests that ascorbate is an effective antioxidant that protects the cells from oxidative stress (Barbehenn *et al.*, 2001). Minerals like potassium, calcium, magnesium, iron and phosphorus are important to silkworm nutrition and their content in the feed is known to influence susceptibility to diseases (Shankar *et al.*, 1999). The contents of K and P in hemolymph are important as these ions help to maintain the blood pH at optimum levels ranging from 6.2 to 6.8.

Experimental evidence indicates that high protein in the diet of silkworms induces high protease activity in the gut, which inactivates nucleopolyhedrosis virus (NPV) (Watanabe *et al.*, 1990). Adverse environmental conditions and poor leaf quality affect silkworms by making them susceptible to flacherie disease (Ono *et al.*, 1969). The resistance to cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) is also influenced by the leaf quality as reported by Ebihara (1966). A lipase having strong antiviral activity against NPV is isolated from the digestive juice of silkworm larvae (Ponnuvel *et al.*, 2003). A soluble NADPH oxidoreductase-like protein (BmNOx) with anti-NPV activity in the digestive juice is identified recently, which inhibited the capability of viral particles to infect *in vitro* (Selot *et al.*, 2007). Some anti-viral factors are known to contain fatty acids and phospholipids, hence are lipoproteins (Funakoshi and Aizawa, 1989; Koizumi *et al.*, 1997), though generally antiviral and anti-bacterial factors are proteins. A glucose-binding lipoprotein is also identified from the hemolymph of silkworm pupae, which is involved in self-defense system (Ujita *et al.*, 2002). Therefore the levels of proteins and lipids in the feed might play a significant role in combating viral and bacterial infections.

The quantitative requirement of nutrients is as important as its quality. It is reported that silkworms fed with leaves containing low protein, low sucrose or high fiber become more susceptible to diseases (Watanabe *et al.*, 1990). Poor quality of leaf having low protein, low sugars and high cellulose content are reported to be one of the predisposing factors for diseases (Nataraju *et al.*, 2002). The quality of mulberry leaf deteriorates under improper storage conditions, thus affecting the survival when over-preserved leaves are fed to silkworms (Samson *et al.*, 1981; Benchamin and Nagaraj, 1987; Sarkar *et al.*, 1992). The larvae become susceptible to diseases like nuclear polyhedrosis (NPV) due to malnutrition or starvation (Benchamin and Nagaraj, 1987), leading to crop losses even in ideal environmental conditions. The starvation and/or infection with pathogens decrease the blood pH, which makes the larvae weak and more susceptible to diseases.

PHYTOCHEMICALS

1. Role in nutrition:

Recent developments on the role of plant secondary metabolites in insect nutrition and survival have thrown light on many interesting facts about plant-insect interactions. Plant allelochemicals are non-nutrients but can interact with essential nutrients to play a role in their assimilation (Reese, 1978), apart from influencing survival of phytophagous insects. Phytochemicals of mulberry leaves like phenolic acids, tannins, flavonoids, terpenoids, alkaloids, etc; do not possess direct nutritive value but they are known to act as anti-oxidant compounds, hence are important for maintenance of health (Felton and Summers, 1995). The primary low molecular weight antioxidants in plants and animals are phenolic compounds, ascorbic acid, α -tocopherol and the tripeptide glutathione (Barbehenn, 2003). One of the phenolic acids is Chlorogenic acid, which is known to be a precursor of antibacterial protein in silkworms (Ito, 1978). The activity of anti-streptococcus protein in the digestive fluid was influenced by the presence of caffeic acid in mulberry (Xu *et al.*, 1994). Red fluorescent protein, which is known to deactivate NPV, is synthesized in the gut with the help of amino acids found in the hemolymph and chlorophyll from the leaf (Hamamura, 2001). The phenolic compounds in mulberry also act as feeding stimulant/deterrent as reported by Uno (1982) who found that the addition of methyl caffeate, ethyl β -resorcyrate, β -resorcylic acid and caffeic acid to artificial diet increased feeding by silkworm larvae whereas 5,7-dihydroxychromone, known to be anti-microbial in nature, has feeding deterrent effect. The content of organic acids in mulberry leaves is known to vary and higher contents of oxalic acid, succinic acid tartaric acid, etc., are detrimental to silkworm health (Minamizawa, 1997).

2. Defense against toxic phytochemicals:

Phytophagous insects accumulate the potentially harmful chemicals like phenolics, peroxides, iron, etc (Barbehenn and Stannard, 2004). However, the presence of carbohydrates implants can mask

the unpalatable taste of some allelochemicals (Glendinning, 2002) and induces feeding. When the nutritional quality is poor or deficient in any one of the major nutrients, it induces more food intake resulting in the accumulation of toxic chemicals from the plant. Peritrophic membranes act as first line of defense, reducing or eliminating the absorption of certain allelochemicals. Besides, an efficient detoxification system helps to overcome this problem (Ahmad and Pardini, 1990). In silkworms, a phenol UDP-glucosyltransferase in the peritrophic membrane of the gut is reported in addition to another previously known detoxification enzyme i.e., cytochrome P-450. The main function of this enzyme is adding glycosyl group to the hydrophobic substances in mulberry leaf to make them water-soluble so that they can be efficiently excreted from the body (Luque *et al.*, 2002). Sugar conjugation is a major pathway for the inactivation and excretion of both endogenous and exogenous compounds. This newly identified enzyme is known to have wide substrate specificity like flavonoids, coumarins, terpenoids and simple phenols (Luque *et al.*, 2002). In another efficient excretory mechanism, oxalic acid in mulberry leaves is combined with calcium to form calcium oxalate - less toxic to silkworms, which is deposited on the integument of newly moulted silkworms as yellowish white substance.

3. Phytochemicals and defense against pathogens:

A strong correlation is shown between levels of certain phytochemicals and susceptibility to viral infection in phytophagous insects (Duffey *et al.*, 1995). Felton *et al.* (1989) have attributed the phytochemicals, which are not major nutrients, a multifunctional role in the growth and survival of insects. From the accumulated information on the mechanism of defense against viral infections involving phytochemicals, Hoover *et al.*, (1998) have short-listed three complex concepts:

1. Multiplicity:

Viral disease is simultaneously influenced by more than one phytochemical, each exerting its effect simultaneously.

2. Interactivity:

A chemical does not influence viral disease independently of other phytochemicals. It interacts with other dietary components; hence, context (presence of other chemicals in the admixture) is important.

3. Multifunctionality:

A chemical often exhibits multiple mechanisms of action in its interactions with other chemicals and/or with baculoviruses.

More reports implicate the oxidation of phenolics by oxidative enzymes as important processes capable of inhibiting baculoviral disease (Felton and Duffey, 1990). Phenoloxidase is known to play a major role in melanization and encapsulation of pathogens (Lee and Berenbaum, 1989). The two enzymes PPO (polyphenoloxidase) and POD (peroxidase) involved in the defense mechanism show a marked preference for oxidizing catecholic phenolics (Felton *et al.*, 1989). In addition, PPO and POD have a significant role in combating viral infections (Hoover *et al.*, 1998). In addition to catecholic phenolics, polymeric phenolics (tannins) have been designated as factors capable of inhibiting mortality of susceptible hosts treated with baculoviruses (Young *et al.*, 1995). An in-depth study, using silkworm can throw more light on the role of phytochemicals in combating pathogens.

SUPPLEMENTS TO ENHANCE SURVIVAL IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*

There are numerous reports on increasing the cocoon or silk yield by the nutrient supplementation, but studies to increase the resistance in silkworms are limited. Supplementation of antibiotics and some botanicals to mulberry leaves were attempted by a few workers to increase the survival in silkworms. Previous reports indicated that Chloromycetin treatment increased resistance to diseases (Murthy and Sreenivasaya, 1953). It also influenced the utilization of nitrogen, minerals and crude

fats to the extent of 7-20% resulting in vigorous growth of larvae (Shyamala *et al.*, 1976). Chloramphenicol fortification increased larval weights and cocoon parameters besides the survival of larvae (Krishnaswami *et al.*, 1980). Bhattacharya *et al.*, (1998) investigated the efficacy of Rifamycin, Chloramphenicol and Cirfan on NPV infected larvae and reported that Rifamycin was proved to be more effective. Nalidixic acid was found to be effective against NPV in silkworms (Choukinath and Savanurmah, 1999).

Leucine methyl ester (Leu-OMe) significantly increases the activity of gut transport system, stimulating amino acid absorption. Consequently, silkworms grow faster and produce 20% heavier cocoon shell weights (Leonardi *et al.*, 2001), however, its effect on the health of silkworms needs to be explored. Supplementation of low amounts of urea (0.2%) and ascorbic acid (0.05%) increased leaf consumption and survival whereas higher dose of vitamin C is reported to cause mortality (Javed and Gondal, 2002). Conversely, oral supplementation of ascorbic acid during young age increased feeding and cocoon yield (El-Karaksy and Idriss, 1990; Madhu Babu *et al.*, 1992). Similarly, the supplementation of higher doses of nicotinamide increased larval mortality due to hypervitaminosis as reported by Etebari and Martindoost (2004). These reports indicate that one should be careful in deciding the concentrations required for supplementation of vitamins and minerals that are required in micro quantities for the silkworm to avoid deleterious effects. In addition, supplementation of ascorbic acid requires further studies to fix the concentration depending on the stage of the larvae. Based on the response obtained through preliminary studies, efforts were made in our Institute to bring out a formulation of feed supplement involving protein source, soluble sugar and vitamins B and C, which increased cocoon yield and survival (Chandrakala and Shivakumar, 1991; Chandrakala *et al.*, 1994).

An important source of inexpensive nutrient supplementation is found to be the aqueous/solvent extracts from common plants (Patil, 2005). Plant extracts are known to increase economical characters of the silkworm like larval, cocoon and shell weights (Murugan *et al.*, 1998). Aqueous plant extracts like *Psoralea corylifolia*, garlic, eucalyptus leaves are reported to decrease disease incidence in silkworms (Patil, 2005). Solvent extraction from plants i. e. *Alteranthera sessilis*, *Eichornia crassipes* and *Coffea arabica* were utilized for fortification of mulberry leaves and results indicated that *Coffea arabica* plant extract increased cocoon weight indicating the presence of certain growth stimulant (Jeyapaul *et al.*, 2003). The application of formulations of botanicals with soya flour as base reduced mortality in silkworms when *Caesalpinia criaria*, *Acacia suma* and *Psoralea corylifolia* sources were utilized (Sivaprakasam, 1999). Aqueous leaf extracts of *P. corylifolia* and *Tribulus terrestris* were effective in reducing NPV infection (Rabindra, 1994). The leaf and root extracts from *Parthenium* plant resulted in the increase of shell weight and survival respectively (Patil *et al.*, 2005). These plant extracts may not contain the major nutrients in sufficient quantity but certainly contain phytochemicals/allelochemicals, which might influence the larval metabolism. The above results emphasize the importance of phytochemicals in silkworm nutrition; perhaps their role is more important than that of major nutrients in maintenance of a high survival rate thus necessitating comprehensive studies.

POTENTIAL APPROACHES

From the available information, the nutrient factors identified to be prerequisite for silkworm health and probable feed supplements based on earlier studies are summed up below. The presence and levels of nutrients and essential phytochemicals in mulberry leaves under different conditions have to be ascertained and bioassay based results can give a fair indication of their importance in deciding the health of silkworms.

Identified Nutrient Factors:

- * High protein content
- * Low levels of nitrates

- * Low levels of free amino acids like arginine
- * High soluble sugar content
- * Low level of organic acids
- * High fatty acid content
- * High sterol content
- * High contents of Vitamins B complex and C
- * High levels of K, Ca, Mg, P.
- * High activity of polyphenoloxidase (PPO)
- * High content of phenolics like caffeic/ chlorogenic acid

More studies are required to arrive at deciding the optimum concentration of ascorbic acid and vitamin B for silkworm health, in the light of conflicting results from its supplementation.

Probable Feed Supplements to increase resistance could include:

- * Enzymes like proteases
- * Amino acids (E.g.: aspartic acid)
- * Soluble sugars
- * β -sitosterol
- * Caffeic acid/ chlorogenic acid
- * Mixture of phytochemicals (tannins, flavonoids)
- * Ascorbic acid
- * Chemicals to increase absorption in the gut like leucine methyl ester
- * Plant extracts with resistance building factors

The available reports indicate that it is possible to develop an effective formulation from the plant source for commercial application as feed supplement.

Studies could be taken up to bring out a formulation that is effective in increasing not only the survival of silkworms but also cocoon yield, thereby enhancing the productivity in mulberry silkworm rearing. More studies in this direction can resolve some of the conflicting issues in the field of silkworm nutrition under tropical conditions.

REFERENCES

- AKIO S. (1995) Bull.Natl.Inst.Seric.Entomol.Sci., Japan, 12, 47-93.
- AHMAD S. & PARDINI R.S. (1990) Antioxidant defense of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*: Enzymatic response to the superoxide-generating flavonoid, quercetin and photodynamic furanocoumarin xanthotoxin. Photochem. Photobiol., 51, 305-311.
- ARUGA H. (1994) Principles of Sericulture. (Translated from Japanese) IBH Publ. Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, pp.365.
- ASANO T. & ASHIDA M. (2001) Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori* - Purification and demonstration of its transport from hemolymph. J. Biol. Chem., 276(14), 11100-11112.
- ASHWATH S.K., PATNAIK A.K., CHATTERJEE S.N. & DATTA R.K. (1992) Analyzing inheritance of digestive amylase vis-à-vis three yield trials. Natl. Conf. Seric. Res., Dec.10-11, CSR&TI, Mysore.
- BARBEHENN R.V. (2001) Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. Arch. Insect Biochem. Physiol., 47, 86-99.
- BARBEHENN R.V. (2003) Antioxidants in grasshoppers: higher levels depend the midgut tissues of a polyphagous species than a gramini vorous species. J. Chem. Ecol., 29(3), 683-702.
- BARBEHENN R.V. & STANNARD J. (2004) Antioxidant defense of midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. J. Insect Physiol., 50, 783-790.

- BARBEHENN R.V., BUNGARNER S.I., ROOSEN E.E. & MARTIN M.M. (2001) Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate –recycling system in the midgut lumen. *J. Insect Physiol.*, 47, 349-357.
- BENCHAMIN K.V. & NAGARAJ C.S. (1987) In *Appropriate Sericulture Techniques*, (Ed: M.S.Jolly), Central Silk Board, Bangalore, India, pp.64-106.
- BHATTACHARYA J., KRISHNAN N., CHANDRA A.K., DAS N.K. & SEN S.K. (1998) Reduction of mortality by some antibiotics in nuclear polyhedrosis of silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 38(1),161-164.
- CHANDRAKALA M.V. & SHIVAKUMAR C. (1991) Effect of fortification of protein, carbohydrate and vitamins on the silkworm, *Bombyx mori*. X Natl Symp. Indian Soc. Life Sci., Sep.26-28, Mysore. (Abstr.)
- CHANDRAKALA M.V., MAHADEVIAH C.R. & SHIVAKUMAR C. (1994) Post-harvest improvement of leaf quality by physical and chemical factors. Annual Rep., KSSRDI, Bangalore, India.
- CHOUKINATH U.S. & SAVANURMATH C.J. (1999) Curative aspects of Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) of silkworm, *Bombyx mori* L., Proc.NSTS-99, pp.263-265.
- DANDIN S.B., BASAVARAJA H.K. & SURESH KUMAR N. (2003) Factors for success of Indian sericulture. *Indian Silk*, 41(9), 5-8.
- DUFFEY S.S., HOOVER K., BONNING B.C & HAMMOCK B.D. (1995) The impact of host plant on the efficacy of baculoviruses. In: *Reviews in Pesticide Toxicology* (Eds: M. Roe & R. Kuhr), CTI Toxicology Communications, Raleigh, North Carolina, pp. 137-275.
- EBIHARA T. (1966) Effect of mulberry leaf quality on resistance of silkworm to a cytoplasmic polyhedrosis virus. Rep. Ibaraki Exp. Stn., 1,61-63.
- EL-KARAKSY I.A. & IDRIS M. (1990) Ascorbic acid enhances the silk yield of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *J. Appl. Entomol.*, 109(1),81-86.
- ETEBARI K. & MARTINDOOST L. (2004) Effects of hypervitaminosis of vitamin B3 on silkworm biology. *J. Biosci.* 29:417-422.
- FELTON G.W. & SUMMERS C.B. (1995) Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 187-197.
- FELTON G.W. & DUFFEY S.S. (1990) Inactivation of a baculovirus by quinones formed in insect-damaged plant tissue. *J. Chem. Ecol.* 16, 1211-1236.
- FELTON G.W., DONATO K., DEL VECCHIO R.J. & DUFFEY S.S. (1989) Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.*, 12, 2667-2694.
- FUNAKOSHI, M. & AIZAWA K. (1989) Viral inhibitory factor produced in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* infected with a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertbr. Path.*, 54 (2),151-155.
- GILLEPIE J.P., KANOST M.R. & TRENCZECK T. (1997) Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.*, 42, 611-643.
- GLENDINNING J.I. (2002) How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet? *Entomol. Exp. Appl.* 104(1),15-25.
- HAMAMURA Y. (2001) *Silkworm Rearing on Artificial Diet* (Translated from Japanese), pp.3-68. IBH Publ, Co, Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- HAYASHIYA K. (1978) Red fluorescent protein in the digestive juice of the silkworm larvae fed on host-plant mulberry leaves. *Entomol. Exp. Appl.* 24, 228-236.
- HOOVER K., YEE J.L., SHULTZ C.M., ROCKE D.M., HAMMOND B.D. & DUFFEY S.S. (1998) Effects of plant identity and chemical constituents on the efficacy of a baculovirus against *Heliothes virescens*. *J. Chem. Ecol.*, 24(2), 221-252.
- HORIE Y. (1999) Silkworm nutrition-Quest for greater promise. In: *Advances in Mulberry Sericulture* (Eds: M.C.Deviah, K.C.Narayanawamy and V.G.Maribashetty), CVG Publ, Bangalore, India. pp.320-344.
- ITO T. (1978) In *Silkworm: An Important Laboratory Tool* (Ed: Y.Tazima),pp.121-157., Kodansha Ltd., Tokyo.

- IZUKA T. (1985) Quantitative analysis of several low molecular antibacterial substances in the digestive juice of fifth instar silkworm larvae. *J. Seric. Sci. Japan*, 54(6), 449-452.
- JAVED H. & GONDAL M.H. (2002) Effect of food supplementation by N and ascorbic acid on larval mortality of silkworm, (*Bombyx mori* L.). *Asian J. Plant Sci.*, 1 (5), 556-557.
- JEYAPPAUL C., PADMALATHA C., RANJIT SINGH A.J.A., MURUGESAN A.G. & DHASARATHAN P. (2003) Effect of plant extracts on nutritional efficiency in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 42 (2), 128-131.
- KINOSHITA T. & INOUE K. (1977) Bactericidal activity of normal cell-free hemolymph of the silkworm, (*Bombyx mori*). *Infection & Immunity*, 16(1), 32-36.
- KOIZUMI N., MOROZUMI A., IMAMURA M., TANAKA E., IWAHANA H. & SATO R. (1997) Lipopolysaccharide-binding protein and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *European J. Biochem.*, 248, 217-224.
- KRISHNASWAMY S., KAMALSINGH S., RAGHURAMAN R., GEETHA DEVI R.G. & BENCHAMIN K.V. (1980) Chloramphenicol as a growth promoter in silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Seric. Symp. & Sem.*, TNAU, Coimbatore, p.34.
- LEE, K. & BERENBAUM M.R. (1989) Action of antioxidant enzymes and cytochrome P-450 monooxygenases in the cabbage looper in response to plant phototoxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 10: 151-162.
- LEONARDI M.G., CASARTELLI M., FIANDRA L., PARENTI P. & GIORDANA B. (2001) Role of specific activators of intestinal amino acid transport in *Bombyx mori* larval growth and nutrition. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 48 (4):190-198.
- LUQUE T., OKANO K. & O'REILLY D.R. (2002) Characterization of a novel silkworm (*Bombyx mori*) phenol UDP-glucosyltransferase. *Eur. J. Biochem.*, 269, 819-825.
- MANCHEV M. (1981) Use of leaves of the dandelion (*Taraxacum officinale* L.) in the feeding of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Vet. Med. Nauki* 18(7), 105-110.
- MADHU BABU, SWAMY M.T., KAMESHWAR RAO & SESHAGIRI RAO M. (1992) Effect of ascorbic acid-enriched mulberry leaves on rearing of *Bombyx mori* L. larvae. *Indian J. Seric.*, 31(2), 111-114.
- MINAMIZAWA K. (1997) Quality of mulberry leaf. In *Moriculture* (Translated from Japanese) (Ed: K. Minamizawa), Oxford & IBH Publ. Co. Ltd., New Delhi, pp.286-315.
- MURTHY M.R.V. and SREENIVASAYA, M. (1953) Effect of antibiotics on the growth of silkworm, *Bombyx mori* L. *Nature*, London, 172, 684.
- MURUGAN K., JEYABALAN D., SENTHIL KUMAR N., SENTHIL NATHAN S. & SIVAPRAKASAM N. (1998) Growth promoting effect of plant products on silkworm. *J. Sci. Ind. Res.*, 57, 740-745.
- NAGATA S., OMORI Y. & NAGASAWA H. (2006) Dietary sterol preference in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(12), 3094-3098.
- NATARAJU B., BALAVENKATASUBBIAH M., SHARMA S.D., SELVAKUMAR T., CHANDRASEKHARAN K. & THIAGARAJAN V. (2002) Silkworm disease management practices during summer. *Indian Silk*, 40 (12), 9-11.
- ONO M., ICHIKAWA C., KATO S., IWANAMI S. & ENOMOTO S. (1969) Relationship between environmental conditions and mulberry leaves in rearing silkworm larvae as observed from outbreak of their flacherie disease. *Bull. Seric. Exp. Stn. Jpn.*, 23(6), 611-616.
- PATIL R.R. (2005) Application of bio-organic products in silkworm cocoon production. Presented at the Workshop on Bio-organics in Sericulture, 18 Nov., KSSRDI, Bangalore, India.
- PATIL R.R., CHANDRAKALA M.V., SUKUMAR J. CHANNAL H.T., KUSUGAL S. & ANKAD G. (2005) Utilization of parthenium in silkworm rearing. *Proc. II Intl. Conf. Parth. Mgmt.*, Dec.5-7, UAS, Bangalore, India, pp.204-207.
- PONNUVEL K.M., NAKAZAWA H., FURUKAWA S., ASAOKA A., ISHIBISHI J., TANAKA H. & YAMAKAWA M. (2003) A lipase isolated from the silkworm, *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.*, 77(19), 10725-10729.
- RABINDRA, R.J. (1994) Investigation on the polyhedral virus disease of *Bombyx mori* L. and their managements. Project Report, TNAU, Coimbatore, India.

- REESE J.C. (1978) Chronic effects of plant allelochemicals on insect nutritional physiology. Ent. Exp. Appl., 24, 425-431.
- SAMSON M.V., NATARAJU B., BAIG M & KRISHNASWAMI, S. (1981) Starvation of *Bombyx mori* L. on cocoon crop and incidence of loss due to diseases. Indian J. Seric., 20 : 42-47.
- SARKAR A.A., QUADER M.A., RAB M.A. & AHMED S.U. (1992) Studies on the nutrient composition of some indigenous and exotic mulberry varieties. Bull. Seric. Res., 3:8-13.
- SELOT R., KUMAR V., SHUKLA S., CHANDRAKUNTAL K., BRAHMARAJU M., DANDIN S.B., LALORAYA M. & KUMAR P.G. (2007) Identification of a soluble NADPH oxidoreductase (BmNOx) with antiviral activity in the gut juice of *Bombyx mori*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 71(1), 200-205.
- SHANKAR M.A., PETERS A. & RANGASWAMY B.T. (1999) Mulberry nutrition: focus on new concepts. In Advances in Mulberry Sericulture (Eds: M.C.Deviah, K.C.Narayanaswamy & V.G.Maribashetty), CVG Publishers, Bangalore., pp.93-122.
- SHANTHA KUMAR K., BHASKAR R.N., GOVINDAN R. & RAVIKUMAR A. (2000) Influence of mulberry leaf maturity on rearing performance and incidence of nuclear polyhedrosis in silkworm, *Bombyx mori* L., Natl. Conf. Strategies Seric. Res. & Devt., 16-18 Nov. 2000, CSRTI, Mysore, India, pp.64-65.
- SHYAMALA M.B., MURTHY M.R.V. AND BHAT J.V. (1976) Effect of chloromycetin on food utilization by the silkworm, *Bombyx mori*. Indian J. Insect Sci., 38, 177-185.
- SIVAPRAKASAM N. (1999) Botanical formulation for management of grasserie disease of the silkworm, *Bombyx mori* L. Proc.NSTS-1999:335-336.
- SMITH C.M. (1989) Plant Resistance to Insects -A Fundamental Approach pp.286, John Wiley & Sons Inc, Canada.
- UJITA M., KIMURA A., NISHINO D., YOKOYAMA E. BANNO Y., FIJII H. & HARA A. (2002) Specific binding of silkworm *Bombyx mori* 30-kDa lipoprotein to carbohydrates containing glucose. Biosci. Biotechnol. Biochem., 66(10), 2264-2266.
- UNO T. (1982) Evaluation of three phenolics from mulberry trees as feeding stimulant/deterrent for larvae of silkworm, *Bombyx mori*. Appl. Ent. Zool., 17(1),137-139.
- VENKATESH C.M. (2000) Studies on the viral and bacterial diseases of silkworm in relation to leaf quality. Ph.D. Thesis, Bangalore University, Bangalore, India.
- WATANABE H., NAGATA M. & WANG Y. (1990) The effect of protein content of an artificial diet on protease and antiviral activities of the gut juice of silkworm, *Bombyx mori*. L. (Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 25, 150-152.
- XU J., LU S., YUNGEN M., CHAUNXI Z., WU X., SHI Z. & ZHANG F. (1994) Silkworm Physiology. Bull. Seric., Hangzhou, P.R. China.
- YOUNG S.Y., YANG J.G. AND FELTON G.W. (1995) Inhibitory effects of dietary tannins on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus to *Helicoverpa zea* (Noctuidae:Lepidoptera). Biol. Control., 5, 145-150.

NOUVELLE PERSPECTIVE SUR LES ASPECTS NUTRITIONNELS ET LA SURVIE DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI L.*

M. V. CHANDRAKALA, V. G. MARIBASHETTY, C. S. GURURAJ, PRAKASH
DHARANI & B. M. SEKCHARAPPA

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

*Les aspects nutritionnels sont un aspect important dans la survie du ver à soie, qui décident en fin de compte du succès des récoltes de cocons. Bien qu'il se soit adapté à la composition nutritionnelle de sa nourriture naturelle, c'est-à-dire la feuille de mûrier, pour sa croissance et son développement, le ver à soie, *Bombyx mori L.* rencontre des contraintes diverses comme l'attaque des pathogènes dans l'environnement et l'accumulation de produits phytochimiques toxiques provenant de la nourriture elle-même. Cependant, il a mis au point plusieurs stratégies, à la fois des processus mécaniques et chimiques pour surmonter ces contraintes, que l'on peut utiliser efficacement dans des conditions environnementales hostiles au cours de son élevage. L'apport de nutriments / de facteurs importants est une stratégie précieuse pour augmenter la tolérance à la maladie pour améliorer la survie du ver à soie.*

INTRODUCTION

Au cours des dernières années, l'adoption de nouvelles technologies comme la culture de variétés de mûrier à rendement élevé, l'élevage de croisements de vers à soie améliorés, l'utilisation de désinfectants de litière, les techniques d'élevage améliorées, etc., dans le but d'obtenir une productivité plus élevée, ont apporté un changement significatif dans le rendement en cocons obtenu par les éleveurs de vers à soie en Inde. Mais les problèmes de faible rendement pendant les saisons / les conditions défavorables persistent encore, à cause des pertes de récoltes dues principalement aux maladies du ver à soie. L'élevage du ver à soie bivoltin, en particulier, est une tâche difficile dans les conditions tropicales et l'une des principales raisons auxquelles on attribue cela, est la mauvaise qualité nutritionnelle des feuilles de mûrier (Dandin et coll., 2003). Bien qu'on arrive à maintenir des conditions environnementales optimales dans la magnanerie, la qualité de la feuille de mûrier n'est pas celle que l'on souhaiterait, même avec des apports agronomiques optimaux, à cause des conditions de température élevée et de faible humidité. L'une des solutions à ce problème est le lignage de races tolérant le stress / les maladies, mais elles sont invariablement associées à une faible productivité (Akio, 1995) et la sélection de souches tolérantes prend du temps. Une alternative adaptée consiste à apporter des compléments aux feuilles, qui renforcent la tolérance aux maladies / au stress chez les larves de vers à soie, pour obtenir un rendement plus élevé en cocons, quelles que soient la saison / les conditions hostiles. Mais, avant d'essayer de mettre au point des compléments, la condition préalable est de comprendre les facteurs complexes impliqués dans la nutrition et la santé. Un grand nombre des rapports sur les interactions insecte – plante qui se sont accumulés au cours des précédentes décennies, suggèrent qu'en dehors des principaux nutriments, les produits phytochimiques, comme les phénols, les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes jouent un rôle décisif

dans le mécanisme de défense des insectes phytophages (Smith 1989 ; Hoover et coll., 1998). On rapporte que les composés phénoliques ont des effets biologiques multiples, y compris une activité antioxydante, en retardant la dégradation oxydative des lipides, et par là même en améliorant la qualité et la valeur nutritionnelle de la nourriture. Cependant, certains de ces produits chimiques ont un effet toxique, et les insectes ont donc mis au point divers mécanismes de détoxification pour surmonter ces obstacles. Ces résultats suggèrent que les produits phytochimiques jouent un rôle important pour prévenir les infections et, en raison de leur activité anti-oxydante, renforcent la vigueur. Ces informations sont essentielles avant de mettre au point un complément nutritionnel efficace, pour améliorer la survie des vers à soie. Dans cet article nous avons essayé de résumer les informations récentes sur les nutriments et les produits phytochimiques, qui influencent la santé des insectes, en se référant plus spécialement aux vers à soie.

SYSTEME DE DEFENSE CHEZ LES VERS A SOIE

Les insectes phytophages ont mis au point des stratégies variées pour s'adapter soit à une plante unique (monophage), soit à un groupe de plantes (polyphage) pour en tirer les nutriments nécessaires. Au cours de leur alimentation, ils sont aussi exposés aux produits chimiques nocifs présents dans la plante hôte elle-même, comme des métabolites secondaires variés. Par conséquent, ces insectes doivent se protéger des menaces suivantes au cours de leur vie i) la nourriture abrasive, ii) les produits phytochimiques toxiques et iii) les pathogènes envahissants (Barbehenn et Stannard, 2004) (Fig. 1). Le ver à soie, *Bombyx mori*, L. un lépidoptère monophage, se nourrit et utilise les nutriments des feuilles de mûrier pour sa croissance et son développement. On s'attend donc à ce que le ver à soie comme les autres lépidoptères s'adapte efficacement à la présence de métabolites secondaires provenant du mûrier, en mettant au point des mécanismes variés pour utiliser ces produits chimiques pour se protéger contre l'accumulation de toxines et de pathogènes. Le ver à soie est sain s'il n'est pas attaqué par les pathogènes ou s'il est assez fort pour combattre l'infection en présence des pathogènes. Bien qu'ils soient définitivement liés, les besoins alimentaires exacts et leurs interactions avec les facteurs physiologiques et pathologiques qui rendent les vers à soie vigoureux, n'ont pas été nettement éclaircis.

On a standardisé l'élevage du ver à soie sur aliment artificiel dans des conditions aseptiques et les doses exactes d'antibiotiques à ajouter, pour diminuer l'incidence des maladies. Cependant, le milieu artificiel n'est pas populaire en Inde à cause de son coût élevé. L'élevage sur les feuilles de mûrier expose les larves de vers à soie à de nombreuses attaques par les pathogènes, et plus encore sous les conditions tropicales. Le ver à soie a mis au point un type d'immunité innée comme les autres insectes phytophages, en ayant recours à plusieurs mécanismes (Fig. 2).

Brièvement, le mécanisme de défense implique en général :

- i) L'exosquelette
- ii) L'intestin moyen :
 - a. La membrane péritrophique
 - b. Le liquide / les enzymes digestifs
- iii) L'hémolymphe :
 - a. cellulaire
 - b. humorale

Les barrières mécaniques contre les pathogènes envahissants comprennent l'exosquelette, c'est-à-dire la cuticule et la membrane péritrophique qui tapissent le système digestif. La cuticule apporte une barrière physique contre les pathogènes dans l'environnement et contre la perte d'eau dans le corps. L'existence de la pro-phénoloxydase dans la cuticule qui est transportée de l'hémolymphe indique qu'elle participe activement au système de défense, quand la peau est victime

d'une blessure (Asano et Ashida, 2001). La membrane péritrophique apporte une barrière mécanique efficace contre les bords abrasifs des feuilles coupées, ce qui protège la couche épithéliale sous-jacente de l'intestin. De plus, on rapporte qu'elle a un rôle multiple pour la défense de l'insecte comme i) l'adsorption, ii) l'ultrafiltration, iii) l'exclusion des polyanions des produits chimiques toxiques ingérés et iv) l'activité antioxydante contre les radicaux libres produits par les activités métaboliques (Barbehenn, 2001).

Le pH alcalin du liquide digestif et certaines enzymes digestives ont un effet anti-viral et anti-bactérien. On a rapporté la présence de plusieurs substances antibactériennes à faible poids moléculaire dans le liquide digestif des vers à soie (Hayashiya, 1978 ; Izuka, 1985). On sait que les insectes possèdent un système immunitaire inné rapidement réactif, qui est bien adapté à leur courte durée de vie. L'immunité de l'insecte est constituée par des réactions cellulaires et humérales. Les réactions cellulaires impliquent la phagocytose, la formation de nodules et l'encapsulation par les plasmotocytes et les granulocytes. D'autre part, les réactions humérales, comprennent la cascade qui active la pro-phénol-oxydase et les protéines immunitaires telles que les lysozymes, les lectines, les protéines antibactériennes et les protéines antifongiques (Gillepie et coll., 1997). Après la découverte de la présence d'une activité bactéricide dans l'hémolymphe sans cellule, rapportée par Kinoshita et Inoue (1977), on a identifié plusieurs facteurs antiviraux et antibactériens dans l'hémolymphe (Hayashiya, 1978). Cependant, il faudrait démarrer des études sur l'effet direct des conditions alimentaires sur la production de facteurs antiviraux et antibactériens.

FACTEURS NUTRITIFS IMPLIQUES DANS LA SURVIE

1. Macro et micronutriments :

La feuille de mûrier est l'unique nourriture du ver à soie, *Bombyx mori* L., la qualité de la feuille influence donc directement sa survie, sa croissance et son développement. La composition chimique des feuilles de mûrier varie en fonction de la variété, de la saison, de la maturité de la feuille et des facteurs environnementaux en dehors des apports agronomiques (Aruga, 1994). Il est évident que tous les principaux macronutriments et micronutriments essentiels influencent directement ou indirectement la survie ou la résistance du ver à soie à la maladie (Horie, 1999). Les essais pour élever les vers à soie sur des plantes alternées comme le pissenlit entraînent une mortalité élevée, bien qu'on puisse lutter contre les maladies par l'ajout d'antibiotiques comme le chloramphénicol (Manchev, 1981). La qualité des nutriments a un effet direct sur l'incidence des maladies du ver à soie ; si les nutriments manquent dans la feuille pendant l'élevage, les risques de maladies virales ou bactériennes augmentent (Shantha Kumar et coll., 2000 ; Venkatesh, 2000). La teneur en eau de la feuille de mûrier influence l'ingestion, la digestion et l'absorption des nutriments mais on sait qu'une teneur trop élevée affecte la digestion en diluant aussi l'hémolymphe ; de plus cela altère le pH et les processus métaboliques normaux (Xu et coll., 1994). La teneur en sucre soluble a un impact direct sur l'épaisseur de la couche de cire du tégument larvaire ; plus la teneur est élevée dans la feuille, plus la couche de cire est épaisse, ce qui empêche la perte d'eau corporelle. La digestion de l'amidon par les races commerciales de ver à soie est plus faible (Ito, 1978) par comparaison aux autres races en raison de la faible activité de l'amylase de l'intestin, qui à son tour, est liée au facteur de résistance des races de ver à soie (Ashwath et coll., 1992). On sait que dans le cas d'un excès d'application d'azote ou de moins de soleil, les feuilles de mûrier contiennent des taux élevés de nitrates et d'acides aminés libres comme l'arginine, ce qui affecte le métabolisme larvaire et augmente la sensibilité à l'infestation par le pathogène (Aruga, 1994). Mais on sait qu'une teneur plus élevée dans un autre acide aminé, à savoir l'acide aspartique, dans la feuille augmente l'ingestion chez les vers à soie. Les études chez le ver à soie sur la préférence en matière de stérol alimentaire montrent que le β -sitostérol est celui qu'ils préfèrent, suivi par l'ergostérol, le cholestérol, et le stigmastérol, tandis que l'ergostérol a un effet inhibiteur sur la croissance larvaire (Nagata et coll., 2006).

Parmi les vitamines, les séries de vitamine B et la vitamine C sont indispensables pour la croissance du ver à soie. La vitamine C est un phagostimulant et on sait qu'elle améliore la survie et le rendement en cocons (Madhu Babu et coll., 1992). Les informations récentes suggèrent que l'ascorbate est un antioxydant efficace qui protège les cellules du stress oxydatif (Barbehenn et coll., 2001). Les minéraux comme le potassium, le calcium, le magnésium, le fer et le phosphore sont importants pour la nutrition du ver à soie et on sait que leur teneur dans la nourriture influence la sensibilité aux maladies (Shankar et coll., 1999). Les teneurs en K et P dans l'hémolymphe sont importantes puisque ces ions contribuent à maintenir le pH du sang aux niveaux optimaux, entre 6,2 et 6,8.

Les expériences montrent qu'une teneur élevée en protéines dans l'alimentation des vers à soie induit une activité de protéase élevée dans l'intestin, qui désactive le virus de la polyédrose nucléaire (NPV) (Watanabe et coll., 1990). Les conditions environnementales hostiles et la mauvaise qualité de la feuille ont un effet sur les vers à soie, en les rendant sensibles à la maladie de la flacherie (Ono et coll., 1969). La qualité de la feuille influence aussi la résistance au virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV) comme l'a rapporté Ebihara (1966). On a isolé une lipase du liquide digestif des larves de vers à soie qui a une forte activité antivirale contre NPV (Ponnuvel et coll., 2003). On a récemment identifié une protéine soluble (BmNOx) comme l'oxydoréductase NADPH, qui a une activité anti-NPV dans le liquide digestif, qui inhibe la capacité des particules virales à infester *in vitro* (Selot et coll., 2007). On sait que certains facteurs anti-viraux contiennent des acides gras et des phospholipides et sont donc des lipoprotéines (Funakoshi et Aizawa, 1989 ; Koizumi et coll., 1997) bien que généralement les facteurs antiviraux et antibactériens soient les protéines. On a aussi identifié une lipoprotéine qui lie le glucose de l'hémolymphe des nymphes de ver à soie, qui est impliquée dans un système d'autodéfense (Ujita et coll., 2002). Les niveaux de protéines et de lipides dans la nourriture pourraient donc jouer un rôle significatif pour combattre les infections virales et bactériennes.

Le besoin quantitatif en nutriments est aussi important que la qualité. On rapporte que les vers à soie qui se nourrissent sur des feuilles qui contiennent peu de protéines, peu de saccharose ou beaucoup de fibres deviennent plus sensibles aux maladies (Watanabe et coll., 1990). On a rapporté qu'une mauvaise qualité de feuille qui a peu de protéines, peu de sucre et une teneur élevée en cellulose est l'un des facteurs qui prédisposent aux maladies (Nataraju et coll., 2002). La qualité de la feuille de mûrier se détériore dans de mauvaises conditions de stockage, et l'alimentation avec des feuilles stockées pendant trop longtemps affecte donc la survie des vers à soie (Samson et coll., 1981 ; Benchamin et Nagaraj, 1987 ; Sarkar et coll., 1992). Les larves deviennent sensibles aux maladies comme la polyédrose nucléaire (NPV) à cause de la malnutrition ou de la faim (Benchamin et Nagaraj, 1987), ce qui entraîne des pertes de récolte même dans des conditions environnementales idéales. La faim et / ou l'infestation par les pathogènes diminuent le pH du sang, ce qui rend les larves faibles et plus sensibles aux maladies.

PRODUITS PHYTOCHIMIQUES

1. Rôle dans la nutrition :

Les développements récents sur le rôle des métabolites secondaires des plantes dans la nutrition des insectes et leur survie ont mis en lumière de nombreux faits intéressants concernant les interactions plante – insecte. Les produits allélochimiques sont des non-nutriments mais peuvent interagir avec des nutriments essentiels pour jouer un rôle dans leur assimilation (Reese, 1978), en plus d'influencer la survie des insectes phytophages. Les substances phytochimiques des feuilles de mûrier comme les acides phénoliques, les tanins, les flavonoïdes, les terpénéïdes, les alcaloïdes, etc.. ne possèdent pas de valeur nutritive directe mais on sait qu'ils agissent comme des composés anti-oxydants, et sont donc importants pour le maintien de la santé (Felton et Summers, 1995). Les principaux anti-oxydants à faible masse moléculaire chez les plantes et les animaux sont les composés phénoliques, l'acide

ascorbique, l' α -tocophérol et le tripeptide glutathion (Barbehenn, 2003). Un des acides phénoliques est l'acide chlorogénique, qui est connu comme un précurseur de la protéine antibactérienne chez les vers à soie (Ito, 1978). L'activité de la protéine anti-streptocoque dans le liquide digestif est influencée par la présence d'acide caféique chez le mûrier (Xu et coll., 1994). La protéine fluorescente rouge, qui est connue pour désactiver le NPV, est synthétisée dans l'intestin à l'aide des acides aminés que l'on trouve dans l'hémolymphe et de la chlorophylle de la feuille (Hamamura, 2001). Les composés phénoliques chez le mûrier agissent aussi comme stimulant / dissuasif alimentaire comme l'a rapporté Uno (1982), qui a trouvé que l'ajout de caféate de méthyle, d'éthyle β -résorcylate, d'acide β -résorcyclique et d'acide caféique au milieu artificiel augmente l'alimentation par les larves de vers à soie tandis que le 5,7 dihydroxychromone, connu pour être de nature anti-microbienne, a un effet dissuasif sur l'alimentation. On sait que la teneur en acides organiques des feuilles de mûrier varie et que les teneurs élevées en acide oxalique, en acide succinique, en acide tartarique sont néfastes à la santé du ver à soie (Minamizawa, 1997).

2. Défense contre les produits phytochimiques toxiques :

Les insectes phytophages accumulent des substances chimiques potentiellement dangereuses comme les phénols, les peroxydes, le fer, etc.... (Barbehenn et Stannard, 2004). Cependant, la présence d'hydrates de carbone peut masquer le goût peu agréable de certaines substances allélochimiques (Glendinning, 2002) et induire l'alimentation. Quand la qualité nutritionnelle de n'importe lesquels des principaux nutriments est mauvaise ou déficiente, cela induit une absorption plus importante de nourriture, ce qui induit l'accumulation de substances chimiques toxiques de la plante. La membrane péritrophique agit comme la première ligne de défense, ce qui diminue ou élimine l'absorption de certaines substances allélochimiques. Par ailleurs, un système de détoxification efficace contribue à surmonter ce problème (Ahmad et Pardini, 1990). Chez les vers à soie, on a signalé un phénol UDP-glucosyltransférase dans la membrane péritrophique de l'intestin en plus d'une autre enzyme de détoxification précédemment connue, le cytochrome P-450. La principale fonction de cette enzyme est d'ajouter le groupement glycosyl aux substances hydrophobiques de la feuille de mûrier pour les rendre solubles dans l'eau, de sorte qu'elles puissent être efficacement excrétées par le corps (Luque et coll., 2002). La conjugaison du sucre est un processus principal pour la désactivation et la sécrétion des composés endogènes et exogènes. On sait que cette enzyme, qui vient d'être identifiée, a une grande spécificité de substrat comme les flavonoïdes, les coumarines, les terpénoïdes et les phénols simples (Luque et coll., 2002). Dans un autre mécanisme de sécrétion efficace, l'acide oxalique des feuilles de mûrier se combine avec le calcium pour former l'oxalate de calcium – moins toxique pour les vers à soie, qui est déposé sur le tégument des vers à soie venant de muer comme une substance blanc jaunâtre.

3. Substances phytochimiques et défense contre les pathogènes :

On a montré une forte corrélation entre les niveaux de certaines substances phytochimiques et la sensibilité à l'infestation virale chez les insectes phytophages (Duffey et coll., 1995). Felton et coll., (1989) ont attribué un rôle multifonctionnel aux substances phytochimiques, qui ne sont pas des nutriments principaux, dans la croissance et la survie des insectes. D'après les informations accumulées sur le mécanisme de défense contre les infestations virales impliquant les substances phytochimiques, Hoover et coll., (1998) ont sélectionné trois concepts complexes :

1. La multiplicité :

La maladie virale est influencée simultanément par plus d'une substance phytochimique, exerçant chacune un effet simultané.

2. L'interactivité :

Une substance chimique n'influence pas une maladie virale indépendamment des autres substances phytochimiques. Elle interagit avec d'autres composants alimentaires ; le contexte (la présence d'autres substances chimiques dans le mélange) est donc important.

3. La multifonctionnalité :

Un produit chimique présente souvent des mécanismes d'action multiples dans ses interactions avec d'autres substances chimiques et / ou des baculovirus.

D'autres rapports impliquent l'oxydation des phénols par les enzymes oxydatifs comme des processus importants capables d'inhiber la maladie baculovirale (Felton et Duffey, 1990). On sait que la phénoloxydase joue un rôle principal dans la mélanisation et l'encapsulage des pathogènes (Lee et Berenbaum, 1989). Les deux enzymes PPO (polyphénoloxydase) et POD (péroxydase) impliqués dans le mécanisme de défense montrent une préférence marquée pour oxyder les phénols catécholiques (Felton et coll., 1989). De plus, PPO et POD ont un rôle significatif pour combattre les infestations virales (Hoover et coll., 1998). En plus des phénols catécholiques, on a désigné les phénols polymériques (les tanins) comme des facteurs capables d'inhiber la mortalité des hôtes sensibles traités avec des baculovirus (Young et coll., 1995). Une étude en profondeur, utilisant le ver à soie pourrait apporter plus de lumière sur le rôle des substances phytochimiques pour combattre les pathogènes.

COMPLEMENTS POUR AMELIORER LA SURVIE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI*

Il existe de nombreux rapports sur l'augmentation du rendement en cocons et en soie par l'apport de nutriments, mais les études sur l'augmentation de la résistance des vers à soie sont limitées. Plusieurs chercheurs ont tenté d'apporter un complément d'antibiotiques et de certaines substances botaniques aux feuilles de mûrier pour augmenter la survie des vers à soie. Des rapports antérieurs indiquent que le traitement à base de chloromycétine augmente la résistance aux maladies (Murthy et Sreenivasaya, 1953). Il influence aussi l'utilisation de l'azote, des minéraux et des graisses brutes de l'ordre de 7 à 20 %, ce qui permet une croissance vigoureuse des larves (Shyamala et coll., 1976). La fortification avec du chloramphénicol augmente les poids des larves et les paramètres des cocons ainsi que la survie des larves (Krishnaswami et coll., 1980). Bhattacharya et coll., (1998) ont étudié l'efficacité de la rifamycine, du chloramphénicol et du Cirfan sur les larves infestées par le NPV et rapporté que la Rifamycine s'avère plus efficace. L'acide nalidixique s'avère efficace contre le NPV chez les vers à soie (Choukinath et Savanurmah, 1999).

L'ester méthylique de la leucine (Leu-OMe) augmente significativement l'activité du système de transport de l'intestin, en stimulant l'absorption des acides aminés. En conséquence, les vers à soie grandissent plus rapidement et produisent des coques soyeuses 20 % plus lourdes (Leonardi et coll., 2001), cependant, il faut étudier son effet sur la santé du ver à soie. L'ajout de faibles quantités d'urée (0,2 %) et d'acide ascorbique (0,05 %) pendant les premiers âges augmente la consommation de feuilles et la survie tandis qu'on rapporte qu'une dose plus élevée de Vitamine C entraîne la mortalité (Javed et Gondal, 2002). Inversement, l'ajout oral d'acide ascorbique pendant le premier âge augmente l'alimentation et le rendement en cocons (El-Karaksy et Idriss, 1990 ; Madhu Babu et coll., 1992). De même, l'ajout de doses plus élevées de nicotinamide augmente la mortalité larvaire en raison de l'hypervitaminose, comme l'ont rapporté Etebari et Martindoost (2004). Ces rapports indiquent qu'il faut faire attention lorsqu'on décide des concentrations nécessaires lors de l'apport de vitamines et de minéraux, qui sont nécessaires en microquantités au ver à soie, pour éviter les effets nuisibles. De plus, l'ajout d'acide ascorbique nécessite des études supplémentaires pour fixer les concentrations en fonction du stade de la larve. D'après la réponse obtenue au cours des études préliminaires, des efforts ont été faits dans notre institut pour apporter une formulation de complément

alimentaire, comprenant une source de protéine, des sucres solubles et des vitamines B et C, qui augmentent le rendement en cocons et la survie (Chandrakala et Shivakumar, 1991 ; Chandrakala et coll., 1994).

On trouve une source importante et bon marché d'apport nutritionnel dans les extraits aqueux / solvants de plantes courantes (Patil, 2005). Les extraits de plantes sont connus pour augmenter les caractères économiques du ver à soie comme les poids de la larve, du cocon et de la coque (Murugan et coll., 1998). On rapporte que les extraits aqueux des plantes comme *Psoralea corylifolia*, l'ail, les feuilles d'eucalyptus diminuent l'incidence des maladies chez les vers à soie (Patil, 2005). On a utilisé les solvants extraits d'*Alteranthera sessilis*, *Eichornia crassipes* et *Coffea arabica* pour la fortification des feuilles de mûrier et les résultats indiquent que l'extrait de *Coffea arabica* augmente le poids du cocon, ce qui indique la présence d'un certain stimulant de croissance (Jeyapaul et coll., 2003). L'application de formulations de substances botaniques avec de la farine de soja comme base diminue la mortalité chez les vers à soie quand on utilise les sources *Caesalpinia criaria*, *Acacia suma* et *Psoralea corylifolia* (Sivaprakasam, 1999). Les extraits aqueux de la feuille de *P. corylifolia* et de *Tribulus terrestris* sont efficaces pour diminuer l'infestation NPV (Rabindra, 1994). Les extraits de feuille et de racine du plant de *Parthenium* entraînent respectivement l'augmentation du poids de la coque et de la survie (Patil et coll., 2005). Ces extraits de plante pourraient ne pas contenir les nutriments principaux en quantité suffisante, mais contiennent certainement des substances phytochimiques / allélochimiques, qui pourraient influencer le métabolisme larvaire. Les résultats ci-dessus soulignent l'importance des substances phytochimiques dans la nutrition du ver à soie, peut-être que leur rôle est plus important que celui des nutriments principaux pour maintenir un taux de survie élevé, ce qui nécessite donc des études approfondies.

APPROCHES POSSIBLES

D'après les informations obtenues dans les études précédentes, nous résumons ci-dessous les facteurs nutritionnels que l'on a identifiés comme nécessaires à la santé du ver à soie et les compléments alimentaires potentiels. Il faut s'assurer de la présence et des niveaux de nutriments et des substances phytochimiques essentiels dans les feuilles de mûrier dans les différentes conditions et les résultats obtenus lors de l'évaluation biologique peuvent donner une indication correcte de leur importance décisive pour la santé des vers à soie.

Facteurs nutritionnels identifiés :

- Teneur élevée en protéines
- Faibles niveaux de nitrate
- Faible niveau d'acides aminés libres comme l'arginine
- Teneur élevée en sucres solubles
- Faible niveau d'acides organiques
- Teneur élevée en acides gras
- Teneur élevée en stérols
- Teneur élevée dans l'ensemble des Vitamines B et C
- Niveaux élevés de K, Ca, Mg, P.
- Activité élevée de polyphénoloxydase (PPO)
- Teneur élevée en phénols comme l'acide caféique / chlorogénique

Des études supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir décider de la concentration optimale en acide ascorbique et en vitamine B pour la santé du ver à la soie, à la lumière des résultats antagonistes sur son apport.

Les compléments alimentaires potentiels pour augmenter la résistance pourraient inclure :

- Des enzymes comme les protéases
- Les acides aminés (par ex. acide aspartique)
- Les sucres solubles
- Le β - Sitostérol
- L'acide caféique / l'acide chlorogénique
- Un mélange de substances phytochimiques (tanins, flavonoïdes)
- L'acide ascorbique
- Les substances chimiques pour augmenter l'absorption dans l'intestin comme l'ester méthylique de leucine
- Les extraits de plantes avec des facteurs de renforcement de la résistance.

Les rapports disponibles indiquent qu'il est possible de mettre au point une formulation efficace en utilisant des plantes comme source, de complément alimentaire, pour une application commerciale.

Des études pourraient être entreprises pour mettre au point une formulation qui est efficace pour augmenter non seulement la survie des vers à soie mais aussi le rendement en cocons, ce qui améliorerait la productivité dans l'élevage du ver à soie du mûrier. Des études supplémentaires dans cette direction pourraient résoudre certaines des questions discordantes en matière de nutrition du ver à soie sous les conditions tropicales.

MULBERRY BREEDING IN INDIA – A CRITICAL REVIEW

A. TIKADER & C. K. KAMBLE

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur – 635 109, Tamil Nadu, India.

The importance of mulberry genotypes are assessed on the basis of two aspects i.e., agronomical adaptability and suitability to silkworm rearing. The agronomic traits like good propagation, early sprouting, fast growing, high biomass yield, wide adaptability to varied agro-climatic conditions, response to organic and inorganic fertilizers, resistance to diseases and pests are important criteria of mulberry breeding. In other words, palatability to silkworm and production of good cocoon quality are the main objectives in mulberry breeding. Improvement in production and quality mulberry leaf could be achieved by developing superior varieties. The horizontal expansion of sericulture in traditional and non-traditional states has succeeded but it is necessary to develop mulberry varieties specific to different agro-climatic zones for vertical development of sericulture industry. At present a good number of mulberry varieties are used for commercial exploitation; nevertheless suitable mulberry varieties are not available for alkaline, saline, acidic soil conditions as well as inundated conditions, sandy soils etc. and therefore the available mulberry genetic resources should be utilized for evolution of mulberry varieties suitable for specific soils prevailing in different agro-climatic zones.

Keywords: Mulberry, *Morus* L. breeding, improvement, India.

INTRODUCTION

Crop improvement plays a major role to increase food, fodder and fibres, providing support to the ever-increasing demand of man. Plant breeding deals with three major approaches i.e., genetic improvement, agronomical practices and plant protection measures. Though mulberry is a perennial heterozygous plant, information on its genetic aspects is lacking. Inheritance pattern is not known for many of the agronomic traits that are rather the basis for conventional methods of breeding. Moreover, pure lines of mulberry are needed in order to study the genetics of mulberry as well as inheritance pattern of particular traits.

Mulberry, the most important crop for sericulture, has different ploidy levels. Most of the genotypes available are diploids ($2n=28$) but the plant exhibits higher ploidy i.e., $3n = 42$, $4n = 56$, $6n = 84$ and docasaploid $22n = 308$ (Basavaiah *et al.*, 1989). Recently, haploid mulberry through *in vivo* anther culture was developed in China (Shoukang *et al.*, 1987). Hence a wide range of mulberry genotypes of different ploidy levels is available for utilization in crop improvement. Due to low leaf yield, slow growth rate and poor feeding performance, genotypes with higher ploidy are not suitable for silkworm rearing. The higher ploidy genotypes have the undesirable characters like coarse leaf, more hairs and less succulence of leaves and, therefore, most of the tetraploids are not used for bioassay (Hamada, 1963; Das *et al.*, 1970; Tojyo, 1985). Though many mulberry varieties are used for sericulture, suitable varieties for alkaline, saline, acidic soil conditions as well as inundated conditions, sandy soil etc. are not available. Therefore the available mulberry genetic resources should be utilized for evolution of mulberry varieties meeting the requirement of specific soil conditions prevailing in different agro-climatic conditions.

MULBERRY LAND RACES IN INDIA

Mulberry improvement programs on sound scientific base were started in the early 1960's; the mulberry breeders could identify some promising clones from the open pollinated hybrid population and also from introduced accessions. Mysore local cultivars with three local types, "Yenne ranginakaddi" (Oil coloured stem), "Boodhukaddi" (Ash colour stem) and "Sultan Kaddi" (introduced by Tippu Sultan) were identified in South India with a yield potential of 10–15 t/ha/year under irrigated condition and half the yield in rainfed condition (4–5 t/ha/year). Similarly Kajli, var. *laciniata*, a local *M. indica* type, was popular in West Bengal, at that time, the second largest silk producer. In Kashmir, sericulture was introduced, as back as 130 B.C., and has a big heritage of mulberry cultivation. The earlier used varieties i.e., Shah tul and Bota tul were popular among sericulturists and abundant in this part of the country. During that period, some exotic varieties were introduced from Japan into Kashmir Valley (Goshoerami, Tsukasaguwa, Ichinose and Kosen). Continuous efforts have been made to utilize the available mulberry genetic resources for the development of sericulture industry. The sericulture department, Government of Karnataka and Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, in South India selected Kanva-2 mulberry varieties and similarly, CSR&TI, Berhampore in North East India, selected Mandalaya (S1). Originally Mandalaya was a clonal selection from seedlings. The seed was collected from the place called Mandalaya, erstwhile Burma (Myanmar). As per suitability, these two varieties (Kanva - 2 and S1) were popularized in the farmer's field and widely adopted both in irrigated and rainfed condition during 1970's and 1980's.

MULBERRY BREEDING IN INDIA

Mulberry breeding was programmed in systematic way in India and the progress was made under different aspects considering the overall need of the sericulture. In the first decade of 1900, when the sericulture industry of Japan began to prosper, existence of natural triploids and their significant contribution to the quality and quantity of silk produced were realized (Oswa, 1916, 1920). These findings opened new vistas in the sphere of mulberry breeding throughout the world.

Morphological variability in mulberry germplasm is reported by various scientists in India and abroad and standard descriptors were adopted in order to record the data and document the same (Cappelozza *et al.*, 1995; Dandin and Jolly, 1986; Dwivedi, 1992; Machii *et al.*, 1997; Tikader and Rao, 2002a). The biodiversity among the mulberry accessions was highlighted by Tikader *et al.*, 2000 whereas Tikader and Dandin, 2005, highlighted the genetic diversity among the collected accessions.

Morpho-anatomical studies have reported to identify the ploidy level indirectly and also predict the variability of mulberry accessions (Banerjee *et al.*, 2006; Sikdar *et al.*, 1986; Tikader *et al.*, 1999; Tikader and Rao, 2001; Yang and Yang, 1995).

Cytological study carried out to know the origin and ploidy status (Basavaiah *et al.*, 1989; Bradshaw, 1972; Chakraborti, 1991; Dandin *et al.*, 1987; Das, 1971; Janaki Ammal, 1948; Dandin *et al.*, 1987; Das, 1961; 1971; Oswa, 1916; 1920).

Reproductive behaviour was studied in details for selection of parents and the scientists also worked in different aspects of reproductive biology of mulberry. Jolly *et al.*, (1987) reported the variation among mulberry germplasm accessions. Similarly, variation was also reported by other scientists i. e., Lev, 1970; Ogurtsov, 1978; Tikader *et al.*, 1995; 1999; 2000; Tikader, 1999; Vijayan *et al.*, 1997b.

Crossability studies were carried out to know the combining ability of different mulberry accessions. Different authors highlighted the merits and demerits of inter and intra-specific crosses (Dandin *et al.*, 1987b; 1989; Dwivedi, 1990; Dzhabarov and Nadzhafarov, 1984; Tikader and Rao, 2002b; Tikader and Dandin, 2007; Vijayan *et al.*, 1994).

Various breeding methods in India are followed in different research Institutes. The conventional breeding method is followed for both artificial crossing and natural open pollinated hybrid selection. A series of elite mulberry accessions were developed through these methods and are recommended for commercial cultivation. The research achievement of research institutes have been highlighted by Yadav (2004 a, b, c). A breakthrough in mulberry breeding was achieved for sustainable cocoon production by evolving V I variety of yield potential 60-70 ton/ha/year (Jalaja *et al.*, 1994). Systematic mulberry breeding methods followed in Japan were highlighted by Sarkar and Fujita (1993a, b, c, d), those authors suggested to follow a similar procedure modified as per Indian conditions. In fact in Japan mulberry is maintained in temperate areas whereas in India it is under tropical condition.

Polyploidy breeding is a hot cake, particularly induction of triploid through various methods: chemicals i.e. colchicines, ethyl methyl sulphonate (EMS), radiation (gamma radiation) etc. Triploid is superior under quality aspects, which is liked by silkworm and preferable for sustainable cocoon production. The polyploidy breeding has been followed by various scientists in India (Das and Prasad, 1970; Dwivedi, 1994; Kedarnath and Lakshmikanthan, 1965; Sastry *et al.*, 1968; Sastry, 1984; Vijayan *et al.*, 1994; Vijayan and Chakraborti, 1998).

A similar method of breeding was also established in China and several scientists have been working for mulberry crop improvement (Guc *et al.*, 1989; Guc and Wang, 1989; Jinhou *et al.*, 1984; Maode *et al.*, 1997; Yang and Yang, 1984; 1989; 1991; Zhanxiong *et al.*, 1989). In Japan a group of scientists have done lot of work on polyploidy breeding by using colchicines and gamma radiation and developed a good number of suitable polyploidy mulberry varieties (Katagiri, 1976; Katagiri *et al.*, 1982; Oshigane and Zhuang, 1990; Tojyo, 1966; 1985). In Russia, methods of polyploidy breeding were tried and suitable varieties developed (Abdullaev, 1970; Aliev, 1977).

The mulberry after development has to be tested in different agro-climatic conditions to know its adaptability to particular ecozones. The scientists have worked in diverse field conditions i.e., irrigated (Das and Chowdhury, 1973; Das and Prasad, 1974; Jalaja *et al.*, 1994; Tikader and Roy, 2003; Tikader and Dandin, 2005.) drought (Dorcus and Vivekanandan, 1997; Susheelamma, 1987; Susheelamma *et al.*, 1990), alkaline, sodic soil (Mohan *et al.*, 2004), saline (Chakraborti *et al.*, 2000, Vijayan *et al.*, 2004a) and other unsuitable areas. But still suitable varieties are not readily available for cultivation under extreme conditions.

The quality test i.e., moisture content and moisture retention of a particular variety is important for silkworm rearing and is tested time to time to find out the acceptability by silkworm (Tikader and Rao, 2002a; Vijayan *et al.*, 1996; 1997a). The leaf quality of different improved varieties is tested in India and abroad with relation to their suitability for silkworm rearing. The suitability of the mulberry varieties have been tested by various authors through chemical analysis and bioassay i. e., Das and Prasad, 1974; Jalaja *et al.*, 1994; Mustafaev, 1968; Sarkar, 1993.

Development of haploid mulberry is a need of the hour to know the genetics of mulberry and in order to enhance the genetic improvement through breeding. Until today some efforts in this regard were performed through tissue culture, natural selection etc. Maode *et al.*, (1996) claimed the discovery of natural haploid of *Morus notabilis* Schneid. Thomas *et al.*, (1999) developed a reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry. Jain *et al.*, (1996); Ravindran *et al.*, (1988); Sethi *et al.*, (1992); Shoukang *et al.*, (1987); Vijayan *et al.*, (2004a) highlighted the importance of tissue culture application in development of haploid cells and crop improvement.

Genotypic variability at molecular level was assessed in different mulberry accessions. The difference between wild and cultivated accessions was reported by Vijayan *et al.*, 2004b; 2006; who highlighted the importance of wild mulberry for crop improvement. A large number of mulberry accessions are maintained in different Institutes of India. To start with, the selection of the original genotype is most necessary to maintain the original characters. In this regard some work at molecular level was attempted to identify duplicate/ similar accessions, as in breeding, the hybrid vigour/ heterotic effects are desirable (Naik and Dandin, 2006). DNA fingerprinting about the origin of

introduced mulberry (*Morus* spp.) accessions was reported in Italy. Some of the introduced accessions showing distinctive phenotypes clearly differentiated from those revealed in the original habitat when they have been selected and adapted, hide identical genotype (Botton *et al.*, 2005). In other crop similar works were also reported in sweet potato (Zhang *et al.*, 1996) and in rice (Virk *et al.*, 1995). The information indicates that similar problem of duplicate accessions exists in other agricultural crops also.

MULBERRY VARIETIES EVOLVED THROUGH BREEDING

Central Sericultural Research & Training Institute (CSR&TI), Berhampore (Murshidabad, West Bengal, India) the pioneer Research Institute of India developed and improved mulberry varieties through, conventional, polyploid and backcross breeding methods. The institute evolved high yielding mulberry varieties like S1, S1635, S799, C776, C763, BC259, TR10, Somaclonal variant (SV1) etc. In addition to this, a good number of mulberry varieties developed by CSR&TI, are awaiting for release. Among these varieties some are suitable for rainfed conditions (C1730), high temperature, and water logging (C2028) up to 30 days, others are saline tolerant (C776) and for hilly conditions (BC259, TR10) (Table I). Evaluation of mulberry varieties in coastal saline soil of West Bengal indicates that C776 (26 t/ha/year) is suitable for saline soil (Chakraborti *et al.*, 2000). Presently some of the accessions are in pipeline and await confirmation through All India Coordinated Experiment – II (C1730, C2016, C2017 and C2028). Besides evolved mulberry accessions are under trial in order to compare their performance with ruling variety (Control S1635). During the initial Evaluation Trial, two new mulberry genotypes i.e., VSB-1 (40.8 t/ha) and VSB-3 (39.0 t/ha) out yielded the ruling variety S1635 (36.1 t/ha). Through preliminary clone comparison trial, four hybrids i. e., CSB-1, RD-6, MC-1 and MC-18 were selected which yield 49 to 65% more than S1635 variety (Yadav, 2004a). Soil salinity is one of the principal factors responsible for deterioration of soils. It is reported that 7 million hectares of soil is saline out of which 3 million ha lies in the coastal regions of West Bengal (Bandopadhyaya, 1985). Twenty-five improved mulberry varieties (Local, S1, SV1, S799, S1708, S1907, C763, C776, C1608, C1614, C1690, C1702, C1726, C1729, C1730, C1733, C1999, C2009, C2010, C2011, C2016, C2017, C2028 including Check S1635) were tested for the saline soil at Canning, 24 Parganas, West Bengal. Variety C776 was found very promising for the saline areas as it was superior to all other varieties in leaf yield (26 t/ha/year) and related characters (Chakraborti *et al.*, 2000).

The Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore (Karnataka, India) conducted mutation breeding and selected S30, S36, S41 and S54 for irrigated conditions from Berhampore local through EMS treatment. Considering the need for rainfed mulberry, CSR&TI, Mysore concentrated on rainfed selection programme (RFS) and developed two varieties namely, RFS-135 and RFS-175 from open pollinated hybrid (OPH) selection of Kanva 2. Likewise other varieties, i.e., S13 and S34 were selected from polycross (mixed pollen). During 1997, the variety V1 having a yield potential of 70 MT/ha/year with superior quality leaf was released to the field. The variety performed better in the Southern States, Maharastra and Orissa. The variety has spread out in 3000 ha. The other varieties evolved for water deficit, rainfed / semi-arid areas are AR-10 and AR-11 which yield 17 and 13% more than control (S-13). AR-12 and AR-14 were evolved which showed higher yield (18%) than control (S-34) under high alkaline soils having pH 8.5 – 9.5, EC- 0.32 – 0.84 mohs/cm. K2 × Kosen, a hybrid variety is found to be suitable for intercropping in coconut fields and it has a yield potential of 44 t/ ha/year. In addition to this, a good number of mulberry genotypes evolved, are under trial, G-4 was found to be better than V1 in leaf yield (9% more) and suitable for late age rearing. Selected G-2 and G-5 genotypes are suitable for chawki rearing (Table II). Several mulberry genotypes were tested on salt and drought under in-vitro (pH 8.5 – 10.0, NaCl 0.2 – 1.0%) and stress media (PEG 1.0 - 4.0%). *M. multicaulis*, LF-2 and Ber.S1 accessions were found tolerant to salt stress (pH 9.0, NaCl, 0.5%).

Table I. Mulberry varieties developed in eastern India.
Tableau I. Variétés de mûrier mises au point dans l'est de l'Inde.

Sl. Region no	Area of cultivation	Variety	Breeding methods & parents used	Leaf yield (t/ha/year)
<i>No. de série</i>	<i>Zone de culture</i>	<i>Variété</i>	<i>Méthodes de lignage et parents utilisés</i>	<i>Rendement foliaire (t / ha / an)</i>
1. Eastern & North eastern India <i>Est et nord-est de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 1	Introduction from Mandalaya (Burma) <i>Introduction en provenance de Mandalaya (Birmanie)</i>	30 - 35
2. Eastern & North eastern India <i>Est et nord-est de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 799	Selection from open pollinated hybrid <i>Sélection à partir d'hybrides obtenus par pollinisation ouverte</i>	35-40
3. Eastern & North eastern India <i>Est et nord-est de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 1635 (Triploid)	Selection from open pollinated hybrid (CSRS-I) <i>Sélection à partir d'un hybride obtenu par pollinisation ouverte (CSRS-I)</i>	40 - 45
4. North India & Foot hills of J&K <i>Nord de l'Inde et collines au pied de J & K</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 146	Selection from unknown source <i>Sélection à partir d'une source inconnue</i>	30 - 35
5. Hills of Eastern India <i>Collines de l'est de l'Inde</i>	Irrigated / Rainfed <i>Irrigué / sans irrigation</i>	TR - 10	Triploid from Ber.S1 <i>Triploïde de Ber. S1</i>	20 - 25
6. Hills of Eastern India <i>Collines de l'est de l'Inde</i>	Irrigated / Rainfed <i>Irrigué / sans irrigation</i>	BC-259	<i>M. indica</i> local crossed with Kosen & twice backcross with Kosen <i>M. indica local croisé avec Kosen & retrocroisement deux fois avec Kosen</i>	18 - 20
7. Eastern India <i>Est de l'Inde</i>	Laterite soil <i>Sol de latérite</i>	C - 763	Hybridization <i>M. multicaulis</i> × Black cherry <i>Hybridation M. multicaulis × Black cherry</i>	30 - 32

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

Sl. Region no	Area of cultivation	Variety	Breeding methods & parents used	Leaf yield (t/ha/year)
No. de série	Zone de culture	Variété	Méthodes de lignage et parents utilisés	Rendement foliaire (t / ha / an)
8. Eastern India <i>Est de l'Inde</i>	Laterite soil <i>Sol de latérite</i>	C - 776	Hybridization <i>M. multicaulis</i> × Black cherry <i>Hybridation M. multicaulis</i> × Black cherry	28 - 30
9. Eastern India <i>Est de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	SV1	Somaclonal variant from tissue culture <i>Variant somaclonal obtenu par culture des tissus</i>	35 - 38
10. Eastern India <i>Est de l'Inde</i>	Non - irrigated (Rainfed, high temperature) <i>Non-irrigué (sans irrigation, température élevée)</i>	C - 2016	Hybridization Hosur local × S162 <i>Hybridation Hosur local</i> × S162	12 - 14
11. Eastern India <i>Est de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	C - 2017	Hybridization Hozur local × S162 <i>Hybridation Hosur local</i> × S162	35 - 39
12. Eastern India <i>Est de l'Inde</i>	Irrigated (Chronic flood prone area) <i>Irriguée (zone sujette à des inondations chroniques)</i>	C - 2028	Hybridization Chinese white × S1532 <i>Hybridation Chinese white</i> × S1532	32 - 36
13. Eastern India <i>Est de l'Inde</i>	Rainfed (Drought prone area) <i>Sans irrigation (zone sujette à la sécheresse)</i>	C - 1730 (Polyploid / polyplioide)	Hybridization T25 × S16 <i>Hybridation T25</i> × S162	13 - 15
14. Eastern India <i>Est de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 1608 (Triploid)	Selection from open pollinated hybrid (CSRS-1) <i>Sélection à partir d'un hybride obtenu par pollinisation ouverte (CSRS-1)</i>	30 - 35

Table II. Mulberry varieties developed in South India.
Tableau II. Variétés de mûrier mises au point dans le sud de l'Inde.

Sl. Region no.	Area of cultivation	Variety	Breeding methods & parents used	Leaf yield (t/ha/year)
No. de série	Zone de culture	Variété	Méthodes de lignage & parents utilisés.	Rendement foliaire (t / ha / an)
1. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	Kanva2	Selection from natural variability <i>Sélection à partir de la variabilité naturelle</i>	30 - 35
2. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 30	EMS treatment from Berhampore local <i>Traitement EMS à partir de Berhampore local</i>	30 - 35
3. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 36	EMS treatment from Berhampore local <i>Traitement EMS à partir de Berhampore local</i>	35 - 40
4. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 54	EMS treatment from Berhampore local <i>Traitement EMS à partir de Berhampore local</i>	40 - 45
5. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	S - 41	EMS treatment from Berhampore local <i>Traitement EMS à partir de Berhampore local</i>	30 - 35
6. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Rainfed <i>Non-irrigué</i>	RFS - 135	Open pollinated hybrid from Kanva 2 <i>Hybride de Kanva 2 obtenu par pollinisation ouverte</i>	10 - 12
7. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Rainfed <i>Non-irrigué</i>	RFS - 175	OPH from Kanva2 <i>OPH à partir de Kanva 2</i>	10 - 12
8. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Rainfed <i>Non-irrigué</i>	S - 13	Selection from poly cross (mixed pollen) progeny <i>Sélection à partir d'une descendance de polycroisements (pollen mélangé)</i>	15 - 17
9. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Rainfed <i>Non-irrigué</i>	S - 34	Selection from poly cross (mixed pollen) progeny <i>Sélection à partir d'une descendance de polycroisements (pollen mélangé)</i>	13 - 17

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

Sl. Region no.	Area of cultivation	Variety	Breeding methods & parents used	Leaf yield (t/ha/year)
<i>No. de série</i>	<i>Zone de culture</i>	<i>Variété</i>	<i>Méthodes de lignage & parents utilisés</i>	<i>Rendement foliaire (t / ha / an)</i>
10. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Rainfed <i>Non-irriguée</i>	MR - 2	Selection from open pollinated hybrids <i>Sélection à partir d'hybrides pollinisés</i>	30 - 35
11. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated <i>Irriguée</i>	Victory-1	Hybrid from S30 × Ber.C776 <i>Hybride S30 × Ber. C776</i>	65 - 70
12. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated (Chawki rearing) <i>Irriguée (élevage chawki)</i>	G - 2	Hybridization <i>M. multicaulis</i> × S34 <i>Hybridation M. multicaulis × S34</i>	38
13. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated (Late age rearing) <i>Irriguée (élevage du dernier âge)</i>	G - 4	Hybridization <i>M. multicaulis</i> × S13 <i>Hybridation M. multicaulis × S13</i>	60 - 65
14. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Semi - arid <i>Semi-aride</i>	AR- 11	Open pollinated selection from K2 <i>Sélection par pollinisation ouverte à partir de K2</i>	15 - 18
15. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated (Alkaline soil, pH 7 - 8.5) <i>Irriguée (sol alcalin, pH 7 à 8,5)</i>	AR- 12	Polyploid breeding S-41 (4X) × Ber.C776) <i>Lignage polyploïde S-41 (4X) × Ber. C776)</i>	23
16. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated under shade <i>Irriguée et à l'ombre</i>	K2 X Kosen	Hybridization Kanva -2 × Kosen <i>Hybridation Kanva-2 × Kosen</i>	44
17. South India <i>Sud de l'Inde</i>	Limited Irrigation (3) <i>Irrigation limitée</i>	RC - 1 / RC- 2	Hybridization Punjab local × Kosen <i>Hybridation Punjab local × Kosen</i>	23 - 25

Further selection of mulberry varieties in different areas within Central Silk Board and state organization were continued and some good mulberry varieties were selected for regional suitability. During this period, few selections namely, Chak Majra, Chinese white, Sujanpur and Gosheorami were isolated in J&K (Table III).

The research institutes continue field trials to find out the adaptability and suitability of mulberry varieties by conducting regional tests. Regional Sericultural Research Station, Sahaspur is conducting some experiment in sodic soil. The mulberry varieties selected for the experiment are S-36, S-54, S-13, S-34, K-2, BC259, TR-10, TR-8, S-799, S-1635, S-1531, C-776 and Chak Majra by relying on the information that these varieties performed well in different agro-climatic zones of the country. The varieties S-146, S-1, S-1635, S-13 and S-34 performed better in the experiment (pH 8 – 9) conducted with three other varieties (BR-2, AR-12, AR-14) under high sodicity conditions (pH 9-10). The experiment indicates that varieties AR-14, BR-2, TR-10, S-146, S-1635, TR-8 and S-1531 are suitable mulberry varieties in sodic soils (Rajat Mohan *et al.*, 2004).

Karnataka State Sericulture Research & Development Institute (KSSR&DI), Thalaghattapura, Bangalore is maintaining a good number of mulberry germplasm. The institute is conducting mulberry breeding for development of improved variety for the benefit of the farmers and recently isolated three varieties namely, DD, Thalaghattapura (TG) and Vishala (Table IV).

Table III. Mulberry varieties developed in Western India.

Tableau III. Variétés de mûrier mises au point dans l'ouest de l'Inde.

Sl. no.	Region	Area of cultivation	Variety	Breeding methods used	Leaf yield (t/ha/year)
No. de série		Zone de culture	Variété	Méthodes de lignage utilisées	Rendement foliaire (t / ha / an)
1	North India <i>Inde du nord</i>	Temperate <i>Tempérée</i>	Chinese white	Clonal selection <i>Sélection clonale</i>	15 - 20
2	North India <i>Inde du nord</i>	Sub-tropical <i>Sub-tropicale</i>	Chak Majra	Selection from natural variability <i>Sélection à partir de la variabilité naturelle</i>	25 - 30
3	North India <i>Inde du nord</i>	Temperate <i>Tempérée</i>	Gosheorami	Introduction from Japan <i>Introduction du Japon</i>	15 - 20
4	North India <i>Inde du nord</i>	Sub-Tropical <i>Sub-tropicale</i>	Sujanpur	Selection from natural variability <i>Sélection à partir de la variabilité naturelle</i>	20 - 25

Table IV. Mulberry varieties developed in South India.

Tableau IV. Variétés de mûrier mises au point dans le sud de l'Inde.

Sl. Region no	Area of cultivation	Variety	Breeding methods used	Leaf yield (t/ha/year)	
No. de série	Zone de culture	Variété	Méthodes de lignage utilisées	Rendement foliaire (t / ha / an)	
1	South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated (high temperature, black and red soils) <i>Irriguée (température élevée, sols noirs et rouges)</i>	DD (Viswa) <i>Sélection clonale</i>	Clonal selection <i>Sélection clonale</i>	35 - 40
2	South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated Southern red soil and North black soils) <i>Sols rouge du sud et noir du nord irrigués</i>	Vishala (Triploid) <i>Triploïde)</i>	Clonal selection <i>Sélection clonale</i>	45 - 50
3	South India <i>Sud de l'Inde</i>	Irrigated (Malnad region & Southern red soils) <i>Irriguée (region de Malnad et sols rouges du sud)</i>	Thalaghattapura <i>Sélection clonale</i>	Clonal selection <i>Sélection clonale</i>	35 - 40

FREQUENCY OF UTILIZED MULBERRY GERMPLASM

Different Research Institutes are involved in developing superior mulberry variety suitable for the sericulture Industry as a whole. But if we go through the pedigree of the genetic materials used for the development of superior variety/varieties, the data indicate that only 38-mulberry germplasm are used as parents in different zones of the country, out of which the research institutes introduced (02), selected (18) and evolved (18). The exotic mulberry germplasm accessions used as parent to develop improved varieties are Kosen, Chinese white, *M. multicaulis*, English black, S-1, Mandalaya etc. and indigenous are CSRS - I, *M. indica* (Local), Hosur Local, S-162, S-1532 etc. in case of CSR&TI, Berhampore. Similar situation is observed in case of CSR&TI, Mysore. Among indigenous, the varieties used are Berhampore local, S30, Ber.C-776, mixed pollen, S34, S13, Kanva-2, S41, Punjab local and exotic Kosen, *M. multicaulis*, etc. In other institutes, the improved varieties were selected based on superior clones and natural variability. Currently in order to develop improved varieties, scientists are using few mulberry accessions, as available parents in their works but extensive efforts are required to utilize various *Morus* species. In fact using the same parents or related parents repeatedly could result in a narrow genetic base knowingly or unknowingly. The scientists are observing more leaf yield/ quality aspects but in the long term this may not be suitable for specific agro-climatic conditions. To avoid such repeated use of a narrow genetic base, long-term preservation of germplasm resources should be aimed at.

ROLE OF MULBERRY GERMPLASM IN BREEDING

The conservation of biodiversity was first encouraged in 1972 at the United Nations Environment Conference (UNEC) at Stockholm, which strongly advocated preservation of irreplaceable genetic resources for the prosperity of present and future generations. Subsequently, the Green Earth summit held in Rio-de Janeiro and other International forums also have echoed the same view on conservation of biodiversity. Today, conservation and protection of available genetic resources have become a necessity at national and international level and the different agencies are engaged in protection of the biological materials. The conservation of mulberry genetic material for possible future use and its subsequent utilization in plant breeding are two highly important spheres of activity in any genetic resources management. But, the success of these actions depends on the availability of descriptive information, which will enable plant breeders to make decisions regarding the materials to be used in the breeding programmes. Central Sericultural Germplasm Resource Centre (CSGRC) at Hosur, Dharmapuri Dist. Tamil Nadu is maintaining 1,100 mulberry genetic resources, out of which 998 accessions already characterized and information is available in order to be utilized by the breeders. Germplasm enhancement or pre-breeding activities are required to be addressed to utilize the wild mulberry species collected from different agro-climatic conditions. Pre-breeding activities include the establishment of populations, which are enriched with specific genes, the transfer of desirable genes from wild species into the genome of a cultivated species through inter-specific and intra specific crosses. Ideally, these activities are needed to be addressed to the breeder's and end users to ensure the maximum use of mulberry germplasm.

MULBERRY WEALTH IN INDIA

CSGRC, Hosur was established under the World Bank - funded National Sericulture Project during February 1991. Like other sericulturally developed countries (China, Japan), India realized the need for collection and conservation of sericultural germplasm. At present, CSGRC maintains 1,100 accessions (Indigenous-836, Exotic-264) collected from different Research Institutes, Universities, State Department of Sericulture, and Farmer's through survey and exploration. The collection of CSGRC represents more than 80% of the institutional resources from 26 countries and the germplasm represents 13 species of mulberry. At the time of collection, information on collection data, passport data and specimen data were also collected. Besides these, other institutes are also maintaining a good number of mulberry accessions, as a safety back - up.

EXPLOITATION OF WILD GENES FOR CROP IMPROVEMENT

The breeders find it difficult to use the unadapted materials from wild source. After doing the crosses, due to the heterozygous condition, the expected results may not be obtained. However, F₁ materials may be further crossed with popular lines to get the desired result. The intermediate populations may be termed as genetically enhanced materials. In fact, breeders prefer to use the genetically enhanced materials with desirable traits in its genetic background widely adapted and elite gene pool. With the advancement of molecular genetics and genetic engineering, the genetic enhancement is possible and may be tried for mulberry crop improvement. In this context, the scientists of CSGRC, Hosur tried some initial breeding programme with wild species (*M. laevigata* and *M. serrata*) and local cultivars and observed some encouraging results. It is possible to transfer some of the desirable gene from wild species to cultivars and vice-versa. More trials are needed in this regard to get suitable results and to incorporate wild genes.

Through survey and exploration, many wild and cultivated forms of mulberry were collected and maintained in the field gene bank. The mulberry collections made from Andaman and Nicobar Islands are different from mainland collections. The desirable traits present in *M. laevigata* collections are

useful for mulberry crop improvement and other purposes. Efforts were made to produce hybrid plants between *M. indica* var. Kanva-2 and *M. laevigata* var. Lamia bay and intra-specific crosses between *M. laevigata* var. Doomarnali and *M. laevigata* var. Lamia bay. The results were published (Tikader and Dandin, 2007).

The wild mulberry is required for inter and intra-specific crosses to enlarge the extent of variability. The valuable genes present in *M. laevigata* should be exploited for transfer of specific genes to high yielding cultivated varieties. The F1 hybrid produced was tested for bioassay study and found suitable for rearing and the performance is comparable with commercial varieties (V1 and S1 variety). A similar result was reported earlier that *M. laevigata* leaves are more suitable when compared to *M. alba* for rearing silkworm.

At present, a handful of mulberry varieties has already been in the field, however suitable mulberry varieties for drought, alkaline, saline and waterlogged conditions in India are yet to be harnessed properly. Plants with suitable characters to face with the adverse climatic conditions are to be judiciously developed through conventional and modern biotechnological tools. Since the optimal ploidy level and heterozygous mulberry germplasm are available, the scope of evolving superior varieties is possible through concentrated efforts.

FUTURE STRATEGIES FOR CROP IMPROVEMENT

The following points may be considered for future mulberry crop improvement programme.

- Proper utilization of available mulberry germplasm.
 - High yielding mulberry varieties are required for problematic soils like alkaline soil, acidic soil, sandy soil, saline soil, sodic soil and waterlogged condition.
 - Use of wild genes to be incorporated in cultivated varieties.
 - Working germplasm need to be selected depending on objectives of the breeding programme.
- Duplicate/ similar mulberry accessions should be identified and tagged.
- Evolution of region specific genotypes to cater the regional needs.
 - Biotechnological approach i.e. marker assisted selection in breeding (MAS), Quantitative Trait Loci (QTL), Introgression of identified beneficial genes are required to utilize the mulberry germplasm in combination with conventional breeding.

REFERENCES

- ABDULLAEV I.K. (1970) Polyploidy in the evolution and breeding of perennial plants. AZ SSR Elmalr Akad Nabrlari. Bio. Iclmlari, No.2. Pp. 42–51.
- ALIEV M.O. (1977) Selenium in breeding mulberry of different ploidy for fruit. Sienu. Biologia 2 Baku AZ SSR, Pp. 96–99.
- BANDOPADHYAY A.K. (1985) Salt content of rain water in coastal area. Science and Culture, 51, 312–313.
- BANERJEE R., CHAKROBORTI, S.P., DAS, B.K. (2006) Morpho-anatomical traits for preliminary screening of mulberry (*Morus* spp.) genotypes for moisture stress. Indian J. Genet., 66, 134–136.
- BASAVAIHAH, DANDIN S.B., RAJAN M.V. (1989) Microsporogenesis in hexaploid *Morus serrata* Roxb. Cytologia, 54, 747–751.
- BOTTONA, BARCACCIA G., CAPPELLOZZA S., DA TOS R., BONGHI C., RAMINA A. (2005) DNA fingerprinting sheds light on the origin of introduced mulberry (*Morus* spp.) accessions in Italy. Genetic Resources and Crop Evolution, 52, 181–192.
- BRADSHAW A.D. (1972) Some of the evolutionary consequences of being a plant. Evol. Biol., 5, 25–47.

- CAPPELLOZZA L., CORRADAZZI A. T., TORNADORE N. (1995) Studies on phenotypic variability of seven cultivars of *M. alba* L. and three of *M. multicaulis* P. (Moraceae) Part I. *Sericologia*, 35, 257 – 270.
- CHAKRABORTI S.P. (1991) Microsporogenesis and anther wall development of a non-dehiscent mulberry (*Morus indica* L.) var. Ber-6. *Journal Tree Sci.*, 10, 86 – 88.
- CHAKRABORTI S.P. BISWAS C.R., VIJAYAN K., ROY B.N., SARATCHANDRA B. (2000) Evaluation of mulberry varieties for coastal saline soils of West Bengal. *Bull. Ind. Acad. Sericulture*, 4, 41– 45.
- DANDIN S.B., JOLLY M.S. (1986) Mulberry descriptor. *Sericologia*, 26: 465 – 475.
- DANDIN S.B., SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S., MALLIKARJUNAPPA R.S., GIRIDHAR K. (1987a) Karyo-morphological studies in a few varieties of mulberry (*Morus* spp.) *Indian J. Sericulture*, 26, 22 – 23.
- DANDIN S.B., KUMAR R., RAVINDRAN S., JOLLY M.S. (1987b) Crossability studies in mulberry. *Indian J. Sericulture*, 26, 1 – 4.
- DANDIN S.B., MALA M.V., RAMESH S.R., BALAKRISHNA R. (1989) Induction of mutation through interspecific grafting. *Current Science*, 58: 1378 – 1380.
- DAS B.C. (1961) Cytological studies on *Morus indica* L. and *M. laevigata* Wall. *Caryologia*, 14, 159 – 162.
- DAS B.C. (1971) Studies on breeding and cytological aspects of mulberry (*Morus* L.) with special reference to its improvement. Ph. D. Thesis, Calcutta University, Calcutta, India.
- DAS B.C., CHOUDHURY, P.C. (1973) Evaluation of improved strains of mulberry II. Assessment of leaf yield. *Proceedings of the 12th International Silk Congress, Barcelona*, 21 – 26 May, Pp. 1– 5.
- DAS B.C. PRASAD, D.N. (1974) Evaluation of some tetraploid and triploid mulberry varieties through chemical analysis and feeding experiment. *Indian J. Sericulture*, 13, 17 – 22.
- DAS B.C. PRASAD, D. N., SIKDAR, A.K. (1970) Colchicine induced tetraploid of mulberry. *Caryologia*, 23: 289–293
- DORCUS D. VIVEKANANDAN M. (1997) Exploitation of mulberry genotypes for drought resistance potential. *J.Seric. Sci. Japan*, 66, 71 – 80.
- DWIVEDI N.K. (1990) Crossability studies in induced tetraploids of mulberry. *Advanced Plant Science*, 3, 269 – 272.
- DWIVEDI N.K. (1992) Cytomorphology of an interspecific triploid hybrid of mulberry. *Advance Plant Science*, 5, 74 – 82.
- DWIVEDI N.K. (1994) Induced autotetraploid in mulberry. *Advance Plant Science*, 7, 35–40.
- DZHAFAROV N.A. NADZHAFAROV F.N. (1984) Production and study of interspecific mulberry hybrids of different ploidy. *Plant Breeding Abstract*, 54: 160.
- GUC Z.X., WANG J.Y. (1989) Study on the induction of mulberry seedlings to tetraploid plant by using colchicines. *Acta Sericologica Sinica*, 15, 13 – 17.
- GUC Z.X., WANG H., SU D.O. (1989) Study on the induction of mulberry tetraploid plants from hybrid seedlings with colchicines. *Acta Sericologica Sinica*, 15, 13 – 17.
- HAMADA, S. (1963) Polyploid mulberry trees in practice. *Indian J. Seric.*, 1, 3 – 4.
- JAIN A.K., SARKAR A., DATTA R.K. (1996) Induction of haploid callus and embryogenesis in in-vitro cultured anthers of mulberry (*Morus indica*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 44: 143–147.
- JANAKI AMMAL E.K. (1948) The origin of black mulberry. *Journal of Horticultural Society*, 73, 117 – 120.
- JALAJA S. KUMAR, SARKAR A., DATTA R.K. (1994) A breakthrough in mulberry breeding for sustainable cocoon production. In: *Global Silk Scenario: Proceedings of International conference on Sericulture, India*, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, Calcutta, Pp. 241 – 247.
- JINHOU YANG, XINHUA YANG (1984) Study on radiation breeding in mulberry (*Morus alba* L.) III. Induced polyploid mutant and its identification. *Acta Sericologica Sinica*, 10: 9 – 12.
- JOLLY M.S., DANDIN S.B., RAVINDRAN S., KUMAR R. (1987) Sexual polymorphism in genus *Morus* L. *Proc. Ind. Acad. Sci. (Plant Science)*. 96, 315 – 320.

- KATAGIRI K. (1976) Polyploidy in mulberry by gamma irradiation. *Mutation Breeding News letter*, 8, 11 – 12.
- KATAGIRI K., NAKAJIMA K., YOKOYAMA T. (1982) The triploidy in mulberry varieties from Thailand. *Journal Sericultural Science, Japan*, 51, 539 – 540.
- KEDARNATH S. LAKSHMIKANTHAN D. (1965) Induction of polyploidy in mulberry, *Morus alba*. *Indian Forester*, 91, 682 – 683.
- LEV L.A. (1970) Study on variability in morphological features of pollen grains of polyploid forms of the genus *Morus* L. In: *Polyploidy Usheikovitsy*, Moscow, USSR, Pp. 45 – 50.
- MAODE YU, ZHONGHUAI XIANG, LICHUN FENG, YIFU KE, XIAOYONG ZHANG, CHENGJUN JING (1996) The discovery and study on a natural haploid *Morus notabilis* Schneid. *Acta Sericologica Sinica*, 22: 67 – 71.
- MAODE Y., CUNLI I., ZHONGHUAI X. (1997) Breeding of new artificial triploid mulberry variety 'Jailing 16'. *Sericologia*, 37: 561 – 565.
- MACHII H., KOYAMA A., YAMANOUCHI H., KATAGIRI K. (1997) Manual for the characterization and evaluation of mulberry genetic resources. *Misc. Pub. Natl. Inst. Seri. Entomol. Sci.* 22: 105 – 124.
- MOHAN R., CHARKRABORTI S., NARAYANAN P., JAISWAL K., SINGH B.D., KHAN M.A. (2004) Thriving of mulberry in sodic land of Uttar Pradesh. *Indian Silk*, 11, 5 -7.
- MUSTAFAEV A.S. (1968) Study on the effect of leaf quality of experimentally obtained triploid mulberry forms on the biological indices of Chinese Silkworm. *Dokl.AKAD NAUK AZ SSR*. 22, 49 –54.
- NAIK V.G., DANDIN S.B. (2006) Identification of duplicate collections in the mulberry (*Morus* spp.) germplasm using RAPD analysis. *Indian J. Genet.*, 66, 287 – 292.
- OGURTSOV K.S. (1978) Morphological characteristics of the pollen of some mulberry varieties in relation to ploidy. *Uzbekistan Biologiya Zurnal*, 2, 71 – 75.
- OSHIGANE K., ZHUANG D. (1990) Effect of in vitro colchicine treatment of culture of isolated buds in mulberry. *J. Seric. Sci. Japan*, 59, 187 – 195.
- OSWA L. (1916) Cytological and experimental studies in *Morus*. *Bull. Seric. Exp. Stn. Japan*, 1, 215 – 300.
- OSWA L. (1920) Cytological and experimental studies in *Morus* with special reference to triploid mutants. *Bull. Seric. Exp. Stn. Japan*, 1, 317 – 369.
- RAVINDRAN S., DANDIN S.B., JAIN A.K. (1988) Application of plant cell, tissue and agriculture in mulberry improvement programmer. *Indian Silk*, 12: 37 –39.
- SARKAR A. (1993) Effect of feeding different races of silkworm (*Bombyx mori* L.) with mulberry (*Morus indica* L.) leaves varying in ploidy level. *Sericologia*, 33, 25 – 34.
- SARKAR A., FUJITA H. (1993a) Japanese system of mulberry breeding: crossing methodology. *Indian Silk*, 8: 5 - .8.
- SARKAR A., FUJITA H. (1993b) Japanese system of mulberry breeding: first selection. *Indian Silk*, 9: 9 – 14.
- SARKAR A., FUJITA H. (1993c) Japanese system of mulberry breeding: crossing methodology. *Indian Silk*, 11: 23 – 27.
- SARKAR A., FUJITA H. (1993d) Japanese system of mulberry breeding: Local trial. *Indian Silk*, 12: 11 – 14.
- SASTRY C.R. (1984) Mulberry varieties, exploitation and pathology. *Sericologia*, 24: 333 – 359.
- SASTRY C.R., VENKATARAMAN, C. KHAN A. A. (1968) Induced tetraploid of an improved strain Kanva-2 of mulberry (*Morus alba*). *Silkworm Information Bulletin*, 1, 95 – 99.
- SETHI M., BOSE S., KAPUR A., RANGASWAMY N.S. (1992) Embryo differentiation in anther cultures of mulberry. *Ind. J. Exp. Biol.* 30: 146 –148.
- SHOUKANG L., DONGFENG J., JUN, Q. (1987) In vitro production of haploid plants from mulberry (*Morus*) anther culture. *Scientia Sinica*, 30, 853 – 863.
- SIKDAR A.K., DWIVEDI N.K., DANDIN S.B., KUMAR R., GIRIDHAR K. (1986) Stomatal chloroplast count technique as a tool to ascertain different ploidy in mulberry. *Indian J. Sericulture*, 25, 88 – 89.

- SUSHEELAMMA B.N. (1987) Evaluation and evolution of drought resistant mulberry varieties for sericulture. Ph. D. thesis, University of Mysore, Mysore, India.
- SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S., GIRIDHAR K., SENGUPTA, K. (1990) Evaluation of germplasm genotypes for drought resistance in mulberry. *Sericologia*, 30, 327 – 341.
- THOMAS T.D., BHATNAGAR A.K. RAZDAN M.K. BHOJWANI S.S. (1999) A reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry, *Morus alba*, L. *Euphytica*, 110: 169 – 173.
- TIKADER A. (1999) Studies on reproductive biological characters in mulberry germplasm (*Morus* spp.). *Bull. Ind. Acad. Seric.* 3, 50 – 57.
- TIKADER A., DANDIN S. B. (2005a) Biodiversity, geographical distribution, utilization and conservation of wild mulberry *Morus serrata* Roxb. *Caspian J. Env. Sci.* 3, 177 – 184.
- TIKADER A., DANDIN S.B. (2005b) Evaluation of *Morus serrata* Roxb. at *ex-situ* germplasm. *Ind. J. Seric.*, 44, 45 – 49.
- TIKADER A., DANDIN S. B. (2007) Pre-breeding efforts to utilize two wild *Morus* species. *Current Science*, 92, 1729 – 1733.
- TIKADER A., RAO A. A. (2001) Morpho-anatomical and pollen studies in mulberry germplasm. *Sericologia*, 41, 69 – 76.
- TIKADER A., RAO A. A. (2002a) Phenotypic variation in mulberry (*Morus* spp.) germplasm. *Sericologia*, 42, 221 – 233.
- TIKADER A., RAO, A. A. (2002b) Intra and Interspecific hybridization studies in mulberry. *Bull. Ind. Acad. Seric.*, 6, 17 – 22.
- TIKADER A., ROY B.N. (2003) Evaluation of mulberry germplasm based on growth and anatomical parameters. *Ind. J. Forestry*, 26, 25 – 29.
- TIKADER A., RAO A. A., MUKHERJEE P. (1999) Stomatal variation and its relation with ploidy levels in mulberry (*Morus* spp.). *Ind. J. Seric.*, 38, 160 – 162.
- TIKADER A., RAO A. A., MUKHERJEE P. (2000) Pollen morphological studies in mulberry germplasm (*Morus* spp.). *Ind. J. Seric.*, 39, 160 – 162.
- TIKADER A., RAO A. A., K. THANGAVELU (2003a) Genetic divergence in exotic mulberry (*Morus* spp.) germplasm. *Sericologia*, 43, 495-501.
- TIKADER A., VIJAYAN K., CHAKROBORTI S.P., ROY B.N. (1999) Sexual behaviour in mulberry germplasm (*Morus* spp.). *Bull. Ind. Acad. Seric.* 3, 33 – 37.
- TIKADER A., VIJAYAN K., RAGHUNATH M.K., CHAKROBORTI S.P., ROY B.N., PAVAN KUMAR T. (1995) Studies on sexual variation in mulberry (*Morus* spp.). *Euphytica*, 84, 115-120.
- TOJYO I. (1966) Studies on polyploid mulberry tree (1) Breeding of artificial autotetraploids. *Bull. Seric. Exp. Stn. Japan*, 20: 187 – 207.
- TOJYO I. (1985) Research of polyploidy and its application in *Morus*. *JARQ*, 18, 222 – 227.
- VIJAYAN K., TIKADER A., CHAKRABORTI S.P., ROY B.N., PAVAN KUMAR T. (1994) Studies on crossability in polyploid breeding. Second National Symposium on prospects of sericulture in India. University of Madras, Vellore, Tamil Nadu, India, March 7–9, pp. 79 – 85.
- VIJAYAN K., TIKADER A., DAS K.K., ROY B.N., PAVAN KUMAR T. (1996) Genotypic influence on leaf moisture and moisture retention capacity in mulberry (*Morus* spp.). *Bull. Seric. Res.*, 7, 95 – 98.
- VIJAYAN K. RAGHUNATH M.K., DAS K.K., TIKADER A., CHAKROBORTI S.P., ROY B.N., QADRI S.M.H. (1997a) Studies on leaf moisture of mulberry germplasm varieties. *Indian J. Seric.*, 36, 155 – 157.
- VIJAYAN K. TIKADER A., ROY B.N., QADRI S.M.H., PAVAN KUMAR T. (1997b) Studies on stigma receptivity in mulberry (*Morus* spp.). *Sericologia*, 37, 343 – 346.
- VIJAYAN K., CHAKRABORTI S.P. (1998) Breeding for triploid mulberry varieties in India. *Indian Journal of Sericulture*, 37: 1-7.
- VIJAYAN K., CHAKRABORTI S.P., GHOSH P.D. (2004a) Screening of mulberry (*Morus* spp.) for salinity tolerance through *in vitro* seed germination. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 47-51.

- VIJAYAN K., KAR P. K., TIKADER A., SRIVASTAVA P. P., AWASTHI A. K., THANGAVELU K., SARATCHANDRA B. (2004b) Molecular evaluation of genetic variability in wild mulberry (*Morus serrata* Roxb.). *Plant Breeding*, 123, 568- 572.
- VIJAYAN K., TIKADER A., KAR P. K., SRIVASTAVA P. P., AWASTHI A. K., THANGAVELU K., SARATCHANDRA B. (2006) Assessment of genetic relationships between wild and cultivated mulberry (*Morus*) species using PCR based markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 873 – 882.
- VIRK P.S. NEWBARY H.J., JACKSON M.T., FORD-LLYOD B.V. (1995) The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 1049 – 1055.
- YADAV B.R.D (2004a) Research achievements of CSB Institutes during IX five-year plan: Highlights – Part I. *Indian Silk*, 6: 9 – 11.
- YADAV B.R.D (2004b) Research achievements of CSB Institutes during IX five-year plan: Highlights – Part II. *Indian Silk*, 7: 11- 14.
- YADAV B.R.D (2004c) Research achievements of CSB Institutes during IX five-year plan: Highlights – Part III. *Indian Silk*, 8: 7 - 9.
- YANG J.H., YANG X.H. (1984) Studies on breeding the mulberry by radiation. 3: Induced polyploid mutant and its identification. *Science of Sericulture*, 10, 9 –12.
- YANG J.H., YANG X.H. (1989) Breeding of artificial triploids in mulberry. *Seric. Sci. Japan*, 15, 65 – 70.
- YANG J.H., YANG X.H. (1991) Research on polyploidy and polyploid breeding in mulberry in China. *Sericologia*, 31, 625 – 630.
- YANG J.H., YANG X.H. (1995) Relationship between stomatal chloroplast number and ploidy levels in mulberry (*Morus* spp.). *Sericologia*, 35: 289 – 292.
- ZHANXIONG GUO, SUIHONG WANG, DADAO SU. (1989) Studies on induction of hybrid mulberry seedlings to tetraploid plants by using colchicines. *Acta Sericologica Sinica*, 5: 13 – 17.
- ZHANG D.P., GHISIAIN M., HUAMAN Z., RODRIGUEZ F., CERVENTES J.C. (1996) Identifying duplicates in sweet potato germplasm using RAPD. In *International Potato Centre Program Report 1995 -96*, International Potato centre, Lima, Peru, Pp. 90 – 95.

REVUE CRITIQUE SUR LE LIGNAGE DU MURIER EN INDE

A. TIKADER & C. K. KAMBLE

Central Sericultural Germplasm Resources Centre, Hosur – 635 109, Tamil Nadu, Inde.

On évalue l'importance des géotypes de mûrier d'après deux caractéristiques, à savoir l'adaptabilité agronomique et la convenance pour l'élevage du ver à soie. Les caractères agronomiques comme la bonne multiplication, la germination précoce, la croissance rapide, un rendement important en biomasse, une grande adaptabilité à des conditions agro-climatiques variées, la réponse aux engrais biologiques et non biologiques, la résistance aux maladies et aux parasites sont des critères importants dans le lignage du mûrier. En d'autres termes, l'appétence pour le ver à soie et la production d'une bonne qualité de cocons sont les principaux objectifs du lignage du mûrier. On peut obtenir l'amélioration de la production et de la qualité de la feuille de mûrier en mettant au point des variétés supérieures. L'expansion horizontale de la sériciculture dans les états traditionnels et non traditionnels a réussi mais il est nécessaire de mettre au point des variétés de mûrier spécifiques aux différentes zones agro-climatiques pour le développement vertical de l'industrie séricicole. A présent, on utilise un grand nombre de variétés de mûrier pour l'exploitation commerciale ; cependant, il n'existe pas de variétés de mûrier adaptées aux conditions de sols alcalin, salin et acide ainsi que pour les conditions d'inondation, de sols sablonneux et il faudrait donc utiliser les ressources génétiques du mûrier pour mettre au point des variétés de mûrier adaptées aux sols spécifiques, qui dominent dans les différentes zones agro-climatiques.

INTRODUCTION

L'amélioration des cultures joue un rôle majeur pour augmenter la nourriture, le fourrage et les fibres, pour soutenir la demande en constante augmentation de l'homme. Le lignage des plantes s'articule autour de trois approches principales, c'est-à-dire l'amélioration génétique, les pratiques agronomiques et les mesures de protection des plantes. Bien que le mûrier soit une plante pérenne, hétérozygote, on manque d'information sur ses aspects génétiques. On ne connaît pas le mode d'hérédité pour de nombreux caractères agronomiques, qui s'appuient plutôt sur des méthodes de lignage conventionnelles. De plus, on a besoin de lignées pures du mûrier pour étudier la génétique du mûrier ainsi que le mode d'héritage de caractères particuliers.

Le mûrier, la culture la plus importante pour la sériciculture, connaît différents niveaux de ploïdie. La plupart des géotypes disponibles sont des diploïdes ($2n = 28$) mais la plante présente une ploïdie plus élevée c'est-à-dire $3n = 42$, $4n = 56$, $6n = 84$ et il existe aussi des docasaploïdes $22n = 308$ (Basavaiah et coll., 1989). On a récemment mis au point un mûrier haploïde en Chine par la culture des anthères *in vivo* (Shoukang et coll., 1987). Il existe donc une gamme étendue de géotypes de mûriers, avec différents niveaux de ploïdie pour l'utilisation dans l'amélioration des cultures. En raison du faible rendement en feuilles, du taux de croissance lent et de leur mauvaise performance comme alimentation, les géotypes avec une ploïdie élevée ne sont pas adaptés à l'élevage du ver à soie. Les géotypes avec une ploïdie importante ont des caractères non désirables comme une feuille épaisse, plus de poils et des feuilles moins succulentes et on n'utilise donc pas la plupart des tétraploïdes pour l'évaluation biologique (Hamada, 1963 ; Das et coll., 1970 ; Tojyo, 1985). Bien qu'on utilise de nombreuses variétés de mûrier pour la sériciculture, il n'existe pas de variétés adaptées

pour les conditions de sol alcalin, salin, acide ainsi que pour les conditions d'inondation, les sols sablonneux, etc. Il faudrait donc utiliser les ressources génétiques du mûrier disponibles pour mettre au point des variétés de mûrier répondant aux besoins des conditions de sol spécifique, qui dominent dans différentes conditions agro-climatiques.

RACES PRIMITIVES DU MURIER EN INDE

Les programmes d'amélioration du mûrier, sur des bases scientifiques saines, ont commencé dès le début des années soixante, les sélectionneurs de mûrier ont pu identifier des clones prometteurs à partir d'une population hybride obtenue par pollinisation ouverte et aussi à partir des variétés introduites. On a identifié les cultivars Mysore local dans le sud de l'Inde avec trois types locaux « Yenne ranginakaddi » (tige de couleur jaunâtre), « Boodhukaddi » (tige de couleur cendrée) et « Sultan Kaddi » (introduit par le Sultan Tippu) avec un potentiel de rendement de 10 à 15 t / ha / an dans des conditions d'irrigation et la moitié du rendement sans irrigation (4 à 5 t / ha / an). De même Kajli, var. *laciniata*, un type local de *M. indica*, est populaire dans le Bengale ouest, à l'époque, le deuxième plus grand producteur de soie. Au Cachemire, la sériciculture a été introduite dès 130 avant J.C. et bénéficiait d'un héritage important en matière de culture du mûrier. Les variétés utilisées auparavant, c'est-à-dire Shah tul et Bota tul sont populaires parmi les sériciculteurs et abondantes dans cette partie du pays. Pendant cette période, des variétés exotiques ont été introduites du Japon, dans la vallée du Cachemire (Goshoerami, Tsukasaguwa, Ichinose et Kosen). Des efforts continus ont été réalisés pour utiliser les ressources génétiques du mûrier disponibles, pour le développement de l'industrie séricicole. Le Département de Sériciculture, du Gouvernement du Karnataka et le *Central Sericultural Research & Training Institute*, de Mysore, dans le sud de l'Inde, ont sélectionné les variétés de mûrier Kanva-2 et de même, le CSR&TI de Berhampore, dans le nord est de l'Inde, a sélectionné Mandalaya (S1). A l'origine, Mandalaya, était une sélection clonale à partir de plantules. La graine a été recueillie dans un endroit appelé Mandalaya, autrefois Birmanie (Myanmar). Compte tenu de leur convenance, ces deux variétés (Kanva-2 et S1) ont été popularisées sur le terrain et largement adoptées dans les conditions d'irrigation et sans irrigation pendant les années soixante dix et quatre vingt.

LIGNAGE DU MURIER EN INDE

On a programmé le lignage du mûrier d'une manière systématique en Inde et des progrès ont été réalisés, concernant différents aspects, en fonction des besoins globaux de la sériciculture. Pendant la première décennie du vingtième siècle, quand l'industrie séricicole japonaise a commencé à prospérer, on a pris conscience de l'existence de triploïdes naturels et de leur contribution significative à la qualité et à la quantité de soie produite (Oswa, 1916, 1920). Ces observations ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine du lignage du mûrier dans le monde entier.

Plusieurs scientifiques, en Inde et à l'étranger, ont rapporté la variabilité morphologique des germoplasmes de mûrier et des descripteurs standards ont été adoptés pour enregistrer les données et les documenter (Cappelozza et coll., 1995 ; Dandin et Jolly, 1986 ; Dwivedi, 1992 ; Machii et coll., 1997 ; Tikader et Rao, 2002a). Tikader et coll., 2000, ont souligné la biodiversité parmi les variétés de mûrier, tandis que Tikader et Dandin, 2005 ont souligné la diversité génétique parmi les variétés recueillies.

On a entrepris des études morpho-anatomiques pour identifier le niveau de ploïdie indirectement et aussi pour prévoir la variabilité des variétés de mûrier (Banerjee et coll., 2006 ; Sikdar et coll., 1986 ; Tikader et coll., 1999 ; Tikader et Rao, 2001 ; Yang et Yang, 1995).

Une étude cytologique a été entreprise pour connaître l'origine et la condition de ploïdie (Basavaiah et coll., 1989 ; Bradshaw, 1972 ; Chakarborti, 1991 ; Dandin et coll., 1987 ; Das, 1971 ; Janaki Ammal, 1948 ; Dandin et coll., 1987 ; Das, 1961 ; 1971 ; Oswa, 1916, 1920).

On a étudié le comportement reproducteur en détail pour la sélection des parents et les scientifiques ont aussi travaillé sur différents aspects de la biologie reproductive du mûrier. Jolly et coll., (1987) ont rapporté une variation entre les germoplasmes de mûrier. De même, d'autres scientifiques, c'est-à-dire Lev, 1970 ; Ogurtsov, 1978 ; Tikader et coll., 1995, 1999 ; 2000 ; Tikader, 1999 ; Vijayan et coll., 1997b, ont décrit la variabilité.

On a réalisé des études sur la capacité de croisement pour connaître la capacité de combinaison de différentes variétés de mûrier. Différents auteurs ont souligné les mérites et les démérites des croisements inter et intra-spécifiques (Dandin et coll., 1987b ; 1989 ; Dwivedi, 1990 ; Dzhaferov et Nadzhafarov, 1984 ; Tikader et Rao, 2002b ; Tikader et Dandin, 2007 ; Vijayan et coll., 1994).

En Inde, les différents Instituts de Recherche suivent des méthodes de lignage variées. On suit une méthode de lignage conventionnelle à la fois pour le croisement artificiel et pour la sélection d'hybride naturels obtenus par pollinisation ouverte. On a mis au point une série de variétés de mûrier supérieures par ces méthodes et elles sont recommandées pour la culture commerciale. Yadav (2004 a, b, c) a mis en exergue les réussites des Instituts. La mise au point de la variété V1, au potentiel de rendement de 60 à 70 tonnes / ha / an, représente une percée en matière de lignage du mûrier pour une production durable de cocons (Jalaja et coll., 1994). Sarkar et Fujita (1993a, b, c, d) ont mis en lumière les différentes méthodes systématiques de lignage du mûrier au Japon, ces auteurs suggèrent de suivre une procédure similaire, modifiée en fonction des conditions indiennes.

En fait, au Japon, le mûrier est maintenu dans les zones tempérées tandis qu'en Inde il est maintenu dans des conditions tropicales.

Le lignage de la polyploidie a réussi, en particulier l'induction de triploïdes par des méthodes variées : par les produits chimiques, c'est-à-dire les colchicines, le sulfonate méthylique d'éthyl (EMS), les rayons (les rayons gamma) etc... Le triploïde est supérieur en qualité, ce qui est apprécié par le ver à soie et préférable pour une production durable de cocons. Plusieurs chercheurs en Inde ont eu recours au lignage de la ploïdie (Das et Prasad, 1970 ; Dwivedi, 1994 ; Kedarnath et Lakshmikanthan, 1965 ; Sastry et coll., 1968 ; Sastry, 1984 ; Vijayan et coll., 1994 ; Vijayan et Chakraborti, 1998).

Une méthode de lignage similaire a aussi été réalisée en Chine et plusieurs chercheurs ont travaillé sur l'amélioration de la culture du mûrier (Guc et coll., 1989 ; Gu et Wang, 1989 ; Jinhou et coll., 1984 ; Maode et coll., 1997 ; Yang et Yang, 1984 ; 1989 ; 1991 ; Zhanxiong et coll., 1989). Au Japon, un groupe de scientifiques a réalisé beaucoup de travaux sur le lignage de la polyploidie en utilisant les colchicines et les rayons gamma et mis au point un bon nombre de variétés de mûrier polyploïdes adaptées (Katagiri, 1976 ; Katagiri et coll., 1982 ; Oshignae et Zhuang, 1990 ; Tojyo, 1966 ; 1985). En Russie, des méthodes de lignage de la ploïdie ont été essayées et des variétés adaptées mises au point (Abdullaev, 1970 ; Aliev, 1977).

Après la mise au point dans différentes conditions agroclimatiques, on doit tester le mûrier pour connaître son adaptabilité dans des écozones particulières. Les scientifiques ont travaillé dans des conditions de terrain variées, dans des conditions d'irrigation (Das et Chowdhury, 1973 ; Das et Prasad, 1974 ; Jalaja et coll., 1994 ; Tikader et Roy, 2003 ; Tikader et Dandin, 2005), de sécheresse (Dorcus et Vivekanandan, 1997 ; Susheelamma, 1987 ; Susheelamma et coll., 1990) de sol alcalin, sodique (Mohan et coll., 2004), salin (Chakraborti et coll., 2000 ; Vijayan et coll., 2004) et également pour d'autres zones peu appropriées. Mais, il n'y a toujours pas de variétés facilement disponibles pour la culture dans des conditions extrêmes.

Le test de qualité c'est-à-dire, de teneur en eau et de rétention de l'eau d'une variété particulière est important pour l'élevage du ver à soie, et on y a recours de temps en temps pour constater l'acceptabilité par le ver à soie (Tikader et Rao, 2002a ; Vijayan et coll., 1996 ; 1997a). On a testé la qualité de la feuille de différentes variétés de mûrier améliorées en Inde et à l'étranger, d'après leur convenance pour l'élevage du ver à soie. Des auteurs variés ont testé la convenance des variétés de mûrier par l'analyse chimique et l'évaluation biologique, en l'occurrence Das et Prasad, 1974 ; Jalaja et coll., 1994 ; Mustafaev, 1968 et Sarkar, 1993.

A l'heure actuelle, il est nécessaire de mettre au point un mûrier haploïde pour connaître la génétique du mûrier et pour accroître l'amélioration génétique par le breeding. Jusqu'à présent, des efforts ont été réalisés, à cet égard, par la culture des tissus, la sélection naturelle, etc. Maode et coll., (1996) revendiquent la découverte d'un haploïde naturel de *Morus notabilis* Schneid. Thomas et coll., (1999) ont mis au point un protocole reproductible pour la production d'haploïdes gynogéniques du mûrier. Jain et coll., (1996) ; Ravindran et coll., (1998) ; Sethi et coll., (1992) ; Shoukang et coll., (1987) ; Vijayan et coll., (2004a) ont souligné l'importance de l'application de la culture des tissus pour le développement de cellules haploïdes et l'amélioration des cultures.

On a évalué la variabilité génotypique au niveau moléculaire chez différentes variétés de mûrier. Vijayan et coll., 2004b ; 2006 ; ont rapporté la différence entre les variétés sauvages et cultivées ; ils ont souligné l'importance du mûrier sauvage pour l'amélioration des cultures. Un grand nombre de variétés de mûriers sont maintenues dans différents instituts en Inde. Pour commencer, la sélection d'un génotype est primordiale pour maintenir les caractères d'origine. A cet égard, on a réalisé certains travaux au niveau moléculaire pour identifier des variétés dupliquées / similaires, puisque dans le lignage, les effets hétérotiques / la vigueur hybride sont désirables (Naik et Dandin, 2006). On a réalisé l'empreinte ADN sur l'origine du mûrier (*Morus* spp.), introduit en Italie. Certaines des variétés introduites, présentant des phénotypes distinctifs clairement différenciés de ceux présents dans l'habitat originel quand on les a sélectionnées et adaptées, cachent un génotype identique (Botton et coll., 2005). On a aussi rapporté des travaux similaires chez d'autres cultures telles que la patate douce (Zhang et coll., 1996) et le riz (Virk et coll., 1995). Cela montre que le problème des variétés doubles existent également chez d'autres cultures.

VARIETES DE MURIER MISES AU POINT PAR LE LIGNAGE

Le *Central Sericultural Research & Training Institute* (CSR&TI), de Berhampore (Murshidabad, Bengale ouest, Inde), l'institut pionnier en matière de recherche en Inde a mis au point et amélioré des variétés de mûrier par des méthodes de lignage conventionnelles, de polyploïdie et de retrocroisement. L'Institut a mis au point des variétés de mûrier à rendement élevé comme S1, S1635, S799, C776, C763, BC259, TR10, un variant somaclonal (SV1) etc.. Un bon nombre de variétés de mûrier mises au point au CSR&TI, attendent d'être autorisées. Parmi ces variétés, certaines sont adaptées pour les conditions sans irrigation (C1730), d'autres pour la température élevée et un sol détrempé pendant 30 jours (C2028), d'autres tolèrent le sel (C776) et sont adaptées aux conditions accidentées (BC259, TR10) (Tableau I). L'évaluation des variétés de mûrier pour le sol salin côtier du Bengale ouest indique que C776 (26 t / ha / an) est adaptée au sol salin (Chakraborti et coll., 2000). A l'heure actuelle, certaines variétés sont en préparation et attendent confirmation auprès de l'*All India Coordinated Experiment – II* (C1730, C2016, C2017 et C2028). De plus, les variétés de mûrier mises au point sont à l'essai pour comparer leurs performances avec la variété standard (Témoin S1635). Pendant l'Essai d'Evaluation initiale, deux nouveaux génotypes de mûrier, c'est-à-dire VSB-1 (40,8 t / ha) et VSB-3, (39 t / ha) ont dépassé en rendement (31,1 t / ha). la variété standard S1635 Grâce à l'essai de comparaison clonal préliminaire, on sélectionne quatre hybrides, c'est-à-dire CSB-1, RD-6, MC-1 et MC-18 qui ont un rendement 49 à 65 % plus important que la variété S1635 (Yadav, 2004a). La salinité du sol est l'un des principaux facteurs responsable de la détérioration des sols. On rapporte que 7 millions d'hectares de sol sont salins, dont 3 millions d'ha situés dans les régions côtières du Bengale ouest (Bendopadhya, 1985). On a testé vingt cinq variétés de mûrier améliorées (Local, S1, SV1, S799, S1708, S1907, C763, C776, C1608, C1614, C1690, C1702, C1726, C1729, C1730, C1733, C1999, C2009, C2010, C2011, C2016, C2017, C2028 y compris le témoin (S1635) pour le sol salin à Canning, 24 Parganas, dans le Bengale ouest. La variété C776 s'avère très prometteuse pour les zones salines, puisqu'elle est supérieure à toutes les autres variétés pour le rendement foliaire (26 t / ha / an) et les caractères associés (Chakraborti et coll., 2000).

Le *Central Sericultural Research & Training Institute*, de Mysore (Karnataka, Inde) a réalisé un breeding de mutants et sélectionné S30, S36, S41 et S54 pour les conditions irriguées à partir de Berhampore local par traitement EMS. Comme on a besoin d'un mûrier ne nécessitant pas d'irrigation, le CSR&TI de Mysore s'est concentré sur un programme de sélection sans irrigation (RFS) et a mis au point deux variétés à savoir, RFS-135 et RFS-175 à partir de la sélection d'un hybride de Kanva-2 obtenu par pollinisation ouverte. De même, d'autres variétés, c'est-à-dire S13 et S34 ont été sélectionnées à partir d'un polycroisement (pollen mélangé). En 1997, la variété V1, avec un potentiel de rendement de 70 t / ha / an et une feuille de qualité supérieure a été autorisée sur le terrain. La variété donne de meilleurs résultats dans les états du sud de Maharastra et d'Orissa. La variété couvre 3000 ha. Les autres variétés mises au point pour les zones connaissant un déficit en eau, sans irrigation / semi sèches sont AR-10 et AR-11 qui donnent un rendement 17 et 13 % supérieur à celui du témoin (S-13). AR-12 et AR-14 ont été mises au point, et présentent un rendement plus élevé (18 %) que le témoin (S-34) dans des sols très alcalins avec un pH de 8,5 à 9,5, une CE de 0,32 à 0,84 mohs / cm. K2 × Kosen, une variété hybride s'avère adaptée pour l'interculture dans les terrains de cocotiers et elle a un potentiel de rendement de 44 t / ha / an. En plus de cela, un bon nombre de génotypes de mûrier mis au point sont à l'essai, on a trouvé G-4 meilleur que V1 pour le rendement foliaire (9 % de plus) et adapté à l'élevage du dernier âge. Les génotypes sélectionnés G-2 et G-5 sont adaptés à l'élevage des jeunes vers (Tableau II). On a testé plusieurs génotypes de mûrier par rapport au sel et à la sécheresse dans des milieux *in vitro* (pH 8,5 à 10,0, NaCl 0,2 à 1 %) et de stress (PEG 1,0 à 4 %). Les variétés *M. multicaulis*, LF-2 et Ber. S1 s'avèrent tolérantes par rapport au stress du sel (pH 9, NaCl, 0,5 %).

Le *Central Silk Board* et des organisations gouvernementales ont continué la sélection ultérieure de variétés de mûrier dans différentes zones et ont sélectionné de bonnes variétés de mûrier adaptées sur le plan régional. Pendant cette période, on a isolé quelques sélections à savoir, Chak Majra, Chinese white, Sujampur et Gosheorami dans le J & K (Tableau III).

Les instituts de recherche continuent leurs essais sur le terrain pour évaluer si les variétés de mûrier sont adaptées et conviennent en réalisant des tests régionaux. La *Regional Sericultural Research Station* de Sahaspur réalise des expériences dans un sol sodique. Les variétés de mûrier sélectionnées pour l'expérience sont S-36, S-54, S-13, S-34, K-2, BC259, TR-10, TR-8, S-799, S-1635, S-1531, C-776 et Chak Majra, compte tenu des bons résultats de ces variétés dans différentes zones agroclimatiques du pays. Les variétés S-146, S-1, S-1635, S-13 et S-34 donnent de meilleurs résultats dans l'expérience (pH 8 à 9) réalisée avec trois autres variétés (BR-2, AR-12, AR-14) dans des conditions très sodiques (pH 9 à 10). L'expérience indique que les variétés AR-14, BR-2, TR-10, S-146, S-1635, TR-8 et S-1531 sont des variétés de mûrier adaptées à des sols sodiques (Rajat Mohan et coll., 2004).

Le *Karnataka State Sericulture Research & Development Institute* (KSSR&DI) de Thalaghattapura à Bangalore maintient un nombre important de germoplasmes de mûrier. L'Institut réalise un lignage du mûrier pour la mise au point d'une variété de mûrier améliorée pour le bénéfice des fermiers et a récemment isolé trois variétés à savoir DD, Thalaghattapura (TG) et Vishala (Tableau IV)

FREQUENCE D'UTILISATION DE GERMOPLASMES DE MURIER

Différents Instituts de Recherche sont impliqués dans la mise au point d'une variété de mûrier supérieure, adaptée à l'industrie séricicole dans son ensemble. Mais si nous passons en revue le pedigree des matériels génétiques utilisés pour la mise au point d'une / de variétés supérieures, les données indiquent qu'on utilise seulement 38 germoplasmes de mûrier comme parents dans différentes zones du pays, parmi lesquels 2 ont été introduits, 18 sélectionnés et 18 mis au point par les instituts de recherche. Les germoplasmes de mûriers exotiques, utilisés comme parents pour mettre au point des variétés de mûrier améliorées sont Kosen, Chinese white, *M. multicaulis*, English black,

S-1, Mandalaya et les variétés indigènes sont CSRS-I, *M. indica* (Local), Hosur local, S-162, S-1532 etc., dans le cas du CSR&TI de Berhampore. On observe une situation similaire dans le cas du CSR&TI de Mysore. Parmi les variétés indigènes, on utilise Berhampore local, S30, Ber.C-776, le pollen mélangé, S34, S13, Kanva-2, S41, Punjab local et Kosen l'exotique, *M. multicaulis*, etc. Dans d'autres instituts, on sélectionne les variétés améliorées, sur la base de clones supérieurs et de la variabilité naturelle. A l'heure actuelle, pour mettre au point des variétés améliorées, les scientifiques utilisent dans leurs travaux quelques variétés de mûrier comme parents disponibles, mais il faudrait entreprendre de très grands efforts pour utiliser des espèces variées de *Morus*. En fait, l'utilisation des mêmes parents ou de parents proches de manière répétée pourrait entraîner une base génétique étroite sciemment ou inconsciemment. Les scientifiques observent plus le rendement foliaire / les aspects qualitatifs mais, à long terme, cela pourrait ne pas être adapté à des conditions agro-climatiques spécifiques. Pour éviter une telle utilisation répétée d'une base génétique étroite, il faudrait cibler une conservation à long terme des ressources génétiques.

ROLE DU GERMOPLASME DE MURIER DANS LE LIGNAGE

On a d'abord encouragé la conservation de la biodiversité, en 1972, à la Conférence de l'Environnement des Nations Unies (UNEC) à Stockholm, qui recommandait fortement la préservation des ressources génétiques irremplaçables pour la prospérité des générations présentes et futures. Par la suite, le Grand Sommet de la Terre, tenu à Rio de Janeiro et d'autres forums internationaux ont aussi fait entendre le même son de cloche sur la conservation de la biodiversité. Aujourd'hui, la conservation et la protection des ressources génétiques est devenue une nécessité au niveau national et international et les différentes agences sont engagées dans la protection des matériels biologiques. Cette conservation du matériel génétique du mûrier pour une utilisation future possible et son utilisation ultérieure dans le lignage des plantes sont deux domaines d'activité très importants dans la gestion de n'importe laquelle des ressources génétiques. Mais le succès de ces actions dépend de l'existence d'une information descriptive, qui permettra aux sélectionneurs de prendre des décisions concernant les matériaux à utiliser dans les programmes de lignage. Le *Central Sericultural Germplasm Resource Centre* (CSGRC) de Hosur, Région de Dharmapuri, Tamil Nadu, maintient 1 100 ressources génétiques du mûrier, dont 998 variétés déjà caractérisées et l'information est disponible pour être utilisée par les sélectionneurs. Il faut avoir recours à des activités d'amélioration des germoplasmes ou de pre-lignage pour utiliser les espèces de mûrier sauvages recueillies dans différentes conditions agroclimatiques. Les activités de pre-lignage comprennent l'établissement de populations, enrichies avec des gènes spécifiques, le transfert de gènes désirables d'espèces sauvages dans le génome d'une espèce cultivée par des croisements inter et intraspécifiques. Dans l'idéal, les sélectionneurs et les utilisateurs finaux doivent avoir recours à ces activités pour s'assurer d'une utilisation maximum des germoplasmes de mûrier.

RICHESSSE DU MURIER EN INDE

Le CSGRC d'Hosur a été établi dans le cadre du Projet de Sériciculture National, financé par la Banque Mondiale en février 1991. Comme d'autres pays développés sur le plan séricicole (Chine, Japon), l'Inde a pris conscience du besoin de recueillir et de conserver les germoplasmes de mûrier. A présent, le CSGRC maintient 1 100 variétés (836 indigènes, 264 exotiques) recueillies dans différents instituts de Recherche, universités, auprès du Département d'Etat de la Sériciculture et auprès des fermiers au travers d'une enquête et d'une exploration. La collection du CSGRC représente plus de 80 % des ressources institutionnelles de 26 pays et la banque génétique concerne 13 espèces de mûriers. Au moment du recueil, on a aussi enregistré les données sur l'identité et les données sur les spécimens. D'autres instituts maintiennent aussi un bon nombre de variétés de mûrier, comme réserve de sécurité.

EXPLOITATION DES GENES SAUVAGES POUR L'AMELIORATION DES CULTURES

Les sélectionneurs trouvent qu'il est difficile d'utiliser des matériels inadaptés provenant d'une source sauvage. Après avoir réalisé les croisements, en raison de l'hétérozygotie, on peut ne pas obtenir les résultats attendus. Cependant, on peut à nouveau croiser les matériels F1 avec les lignées populaires pour obtenir le résultat désiré. On peut appeler les populations intermédiaires « matériels génétiquement améliorés ». En fait, les sélectionneurs préfèrent utiliser les matériels génétiquement améliorés avec des caractères désirables très adaptés de leur fonds génétique et du pool génétique supérieur. Avec les avancées de la génétique moléculaire et du génie génétique, l'amélioration génétique est possible et on peut y avoir recours pour l'amélioration de la culture du mûrier. Dans ce contexte, les chercheurs du CSGRC d'Hosur ont entrepris un programme de lignage initial avec des espèces sauvages (*M. laevigata* et *M. serrata*) et des cultivars locaux et observé des résultats encourageants. Il est possible de transférer certains des gènes désirables des espèces sauvages aux cultivars et vice versa. Des essais supplémentaires sont nécessaires, à cet égard, pour obtenir des résultats appropriés et incorporer les gènes sauvages.

On a recueilli et maintenu de nombreuses formes sauvages et cultivées du mûrier grâce à des enquêtes et à des explorations et on les a maintenues dans la banque génétique de terrain. Les collections de mûrier réalisées dans les Iles Andaman et Nicobar sont différentes des collections du continent. Les caractères désirables présents chez les collections de *M. laevigata* sont utiles pour l'amélioration de la culture du mûrier ainsi que pour d'autres finalités. Des efforts ont été faits pour produire des plants hybrides entre la var. Kanva-2 de *M. indica* et la var. Lamia bay de *M. laevigata* et des croisements intra-spécifiques entre var. Doomarnali de *M. laevigata* et var. Lamia bay de *M. laevigata*. Les résultats ont été publiés (Tikader et Dandin, 2007).

On a besoin du mûrier sauvage pour des croisements inter et intra-spécifiques pour élargir le degré de variabilité. Les gènes précieux présents chez *M. laevigata* devraient être exploités pour le transfert de gènes spécifiques chez des variétés cultivées à rendement élevé. On a testé l'hybride F1 obtenu lors de son évaluation biologique et il s'avère adapté pour l'élevage et sa performance est comparable à celle des variétés commerciales (variétés V1 et S1). On a déjà rapporté des résultats similaires selon lesquels les feuilles de *M. laevigata* sont plus adaptées que celles de *M. alba* pour l'élevage du ver à soie.

A présent, quelques variétés de mûrier sont déjà utilisées sur le terrain, cependant il reste encore à exploiter des variétés de mûrier adaptées pour les conditions de sécheresse, d'alcalinité, de salinité et de sol détrempé en Inde. Il faut judicieusement mettre au point des plantes aux caractères appropriés pour faire face aux conditions climatiques hostiles au moyen d'outils biotechnologiques conventionnels et modernes. Puisqu'on dispose du niveau optimal de ploïdie et de germoplasmes de mûriers hétérozygotes, il est possible de mettre au point des variétés supérieures, en concentrant ses efforts.

FUTURES STRATEGIES POUR L'AMELIORATION DES CULTURES

Il faudrait prendre en considération les points suivants dans le cadre d'un futur programme d'amélioration de la culture du mûrier.

- Utilisation correcte du germoplasme de mûriers adaptés
- Il est nécessaire d'avoir des variétés de mûrier à rendement élevé pour des sols problématiques comme le sol alcalin, le sol acide, le sol sablonneux, le sol salin, le sol sodique et les inondations.
- Utilisation des gènes sauvages à incorporer chez les variétés cultivées.
- Il faut sélectionner un germoplasme opérationnel en fonction des objectifs du programme de lignage. Il faut identifier et marquer les variétés doubles / similaires.

- Mise au point de géotypes spécifiques aux régions pour répondre aux besoins régionaux
- Il faut une approche biotechnologique, c'est-à-dire une sélection assistée par marqueur dans le lignage (MAS), les Loci des Caractères Quantitatifs (QTL), une introgression des gènes bénéfiques identifiés pour utiliser les germoplasmes de mûrier en combinaison avec le lignage conventionnel.

ADAPTIVE OVIPOSITIONAL PREFERENCE OF THE UZIFLY, *EXORISTA SORBILLANS* (DIPTERA: TACHINIDAE) ON SILKWORM

B. M. PRAKASH^{1,2}, M. T. DIVYANANDA¹, S. ANANDA¹, H. RAVIKUMAR¹,
B. C. KESHAVA MURTHY¹ & H. P. PUTTARAJU¹

¹Laboratory of Seribiotechnology, Department of Life Science and Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560056, India.

²Present address: Evolutionary biology laboratory, Evolutionary biology and Organismal Biology Unit, Jawaharlal Nehru Center for Scientific Research, Jakkur, Bangalore - 560064, India.

The uzifly, Exorista sorbillans a serious tachinid endoparasitoid of the silkworm, Bombyx mori, uses an array of cues to locate suitable host larvae for oviposition. We conducted an experiment to examine host selection, location and ovipositional behavior of the fly pest. The results illustrate that the female uzifly not only prefers healthy larvae to lay her eggs but also prefers ventro-lateral side in between inter-segmental region on host's larval bodies. These results suggest that the healthy silkworm larvae may release a chemical cue called kairomone which may attract the uzifly, alternatively, the adaptive ovipositional preference by female uzifly to minimize potential mortality of eggs and/or newly hatched maggots, whereas the diseased or unhealthy silkworm larvae may not release kairomone or the kairomone may be diluted with the smell of decaying cells due to diseases, thereby avoids laying of eggs on such diseased worms. Further, the ventro-lateral side of silkworm Bombyx mori has high density of body hairs that signals the uzifly to lay her eggs, than other parts that may not contain that much of hairs due to rubbing off when crawling between supplied mulberry leaves, the uzifly may learn that by laying their eggs in between intersegmental region of ventro-lateral side on healthy larvae may enhance the surviving offspring. The uzifly preference of host selection, location and ovipositional behaviors among healthy and diseased larvae are discussed.

Keywords: Ovipositional behavior, chemical cues, *Exorista sorbillans*, *Bombyx mori*, diseased larvae, host location

INTRODUCTION

It is a widely accepted fact that insects use a hierarchy of behavioral cues in host selection and this was first recognized in parasitoids and later in phytophagous insect (Kennedy, 1965). An array of host selection mechanisms by tachinid's includes habitat location, host location, host acceptance, and host use (Tanaka, *et al.*, 1999; Stireman *et al.*, 2006). In addition, insect uses a number of sensory cues in host selection including visual, olfactory, gustatory and tactile stimuli as well as humidity and light intensity (Bernays and Chapman, 1994; Stireman, 2002; Stireman and Singer, 2003; Puttaraju, *et al.*, 2004). These cues stimulate receptors, generating sensory input and finally behavioral responses, then female insect lands on the host and further assesses it by chemoreception, through receptors on the feet and mouthparts (Courtney and Kibota, 1990). Further, the tachinid flies generally attack active life stages of their hosts (Stireman, *et al.*, 2006). In nature, there likely exists a dynamic interplay between behavioral mechanisms of host location that determine which hosts are attacked

and subsequent selection due to location efficiency and host-related performance that shapes the evolution of these mechanisms.

The uzifly, *E. sorbillans* a tachinid endoparasitoid of the silkworm, *Bombyx mori* L. causes a severe loss accounting for 15 to 20% to the sericultural farming community in India (Narayanaswamy and Devaiah, 1998). A number of scientists have been working on this uzifly menace including its biology (Devaiah, *et al.*, 1992; Manjunatha, 1993; Manjunatha and Puttaraju, 1993) and control measures (Shivashankarappa and Puttaraju, 1995). The ovipositional behavior was studied earlier by Narayanaswamy, *et al.*, (1992) and they found that the female uziflies lay her eggs on dorsal side followed by lateral and ventral side. We conducted experiments not only on the ovipositional selection on healthy and diseased silkworm hosts, but also on the ovipositional location. Such investigations may provide useful information for the control of uziflies in silkworm rearing areas.

MATERIALS AND METHODS

Uzifly rearing:

The flies used in this study were between third and fourth generation of individuals reared from the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) collected from silkworm cocoon market at Ramanagara of Karnataka, India, soon after they pierced out of their infested host silkworm cocoons. The maggots were allowed to metamorphose into pupae and then to adults in the wire mesh netted cages of 35 × 35 × 35 cm. In order to ensure virginity, the male and female adult flies were separated immediately after emergence based on genitalia and other morphological sex-specific characters. The flies were provided with 8% glucose at 26 ± 1° C and relative humidity of 65 to 70% with 12:12h light:dark condition. After a day of emergence, one female fly was crossed with two male flies (to ensure coupling) for about 24 hours with six replications.

Silkworm collection and disease induction:

Third instar silkworm larvae of *Bombyx mori* were collected from silkworm rearing center of Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore. The pure extract and culture of disease causing microbes i.e., nuclear polyhedrosis virus (1000 virus per ml) which causes viral grasserie, *Bacillus satto* (800 bacteria per ml), which causes bacterial flacherie and fungus, *Beauveria bassiana* (800 fungal spores per ml), which induces white muscardine in silkworms were obtained from silkworm pathology section of Karnataka State Sericultural Research and Development Institute, Bangalore. The mulberry leaves sprayed with these microbes were fed to the silkworm on first day of fourth instar. One thousand diseased and healthy silkworm larvae were reared in the laboratory by following standard rearing technique (Dandin, *et al.*, 2003) up to spinning.

Ovipositional choice of uziflies on disease infected and uninfected silkworm larvae:

In each uzifly cage, fifteen early fifth instar silkworm larvae of healthy and different diseased were placed for oviposition of uziflies. The supplied larvae were replaced at every 12 hours up to four days. Immediately after silkworm larvae were taken out from each cage, the fecundity and egg hatch rate were calculated by counting the individual eggs and the black scars, which were found upon laying and hatching, respectively on the bodies of silkworm larvae. The host larvae were further reared in the laboratory by following cellular rearing technique for further observations on development of maggots.

Studies on host location behavior:

This study was undertaken to explore the host location (site selection) behavior of the uziflies. Separate cages with one female and two males were allowed for mating and for oviposition on silkworm larvae. One thousand larvae were used for this study.

Statistical analysis:

The data obtained were analyzed by one-way ANOVA due to Gaussian distribution in MS Excel version 5.0 and as methods described by Khan and Khanum (1994).

RESULTS**Ovipositional behavior of uziflies:**

In the laboratory, the ovipositional preference of the uzifly, *Exorista sorbillans* on silkworms infected with different diseases as well as on healthy silkworm larvae have been observed. The observations reveal that the female uzifly prefers to lay maximum number of eggs on healthy larvae (78.97%) followed by its preference to lay eggs on flacherie (bacterial disease of silkworm) (9.55%), on grasserie (viral disease) (6.97%) and on muscardine disease (fungal disease) (4.51%) infected larvae ($f = 562.17$; $df = 23$; $p < 1.799E-19$) (Table I).

Hatching rate of eggs and their development:

The rate of egg hatch on different infected and uninfected silkworm larvae were undertaken to study the influence of various silkworm diseases on the uzifly egg hatching and developmental rates. The study illustrate that the maximum hatching rate is recorded on healthy silkworm larvae (74.78%) followed by egg hatch on flacherie-infected larvae (56.15%), muscardine (41.96%) and on grasserie diseased larvae (39.28%). However, on the later two, the egg hatch percentage was almost similar, ($f=249.75$; $df=23$; $p < 5.159E-16$) (Table I).

The development of these hatched uzi maggots in healthy and diseased larvae were different. The development of uzi maggots from the hatched eggs in healthy silkworm larvae was 94.4% when compared to that of diseased silkworm larvae, which yield 38.48%, 51.73 and 46.54% maggot development in flacherie, grasserie and muscardine-infected silkworm larvae ($f = 242.37$; $df = 23$; $p < 6.907E-16$) (Table I).

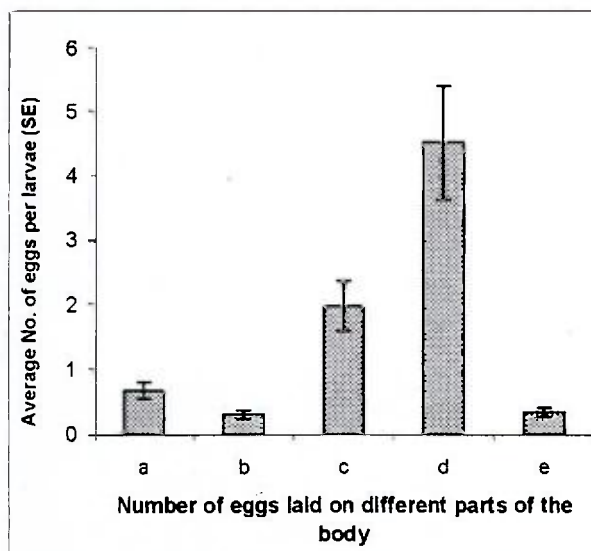


Fig. 1. Mean number of eggs laid by uzifly on different parts of silkworm, *Bombyx mori* L.

Fig. 1. Nombre moyen d'oeufs pondus par la mouche uzi sur différentes parties du ver à soie, *Bombyx mori* L.

Average No. of eggs per larvae / Nbre moyen d'oeufs par larve.

- a. Dorsal side / Côte dorsal.
- b. Dorsolateral side / Côte dorsolatéral.
- c. Lateral side / Côte latéral.
- d. Ventrolateral side / Côte ventrolatéral.
- e. Ventral side / Côte ventral.

Table I. Host preference of uzifly for egg laying and egg hatch rate on healthy and on different diseased silkworm, *B. mori*.

Tableau I. Préférence de la mouche uzi en matière d'hôte sur des vers à soie, *B. mori*, sains et atteints de différentes maladies, pour la ponte d'oeufs et le taux d'éclosion des oeufs.

Sl. No	Type of larvae	No. of replications (n)	Average No of larvae provided / cage	Average no. of parasitised larvae (± SE)	Average fecundity (± SE)	Average egg hatch (± SE)	Egg hatch rate (%) (± SE)	No. of maggots emerged	Pupation rate	No. of flies emerged
No. de série	Type de larves	Nbre de répétitions (n)	Nbre moyen de larves fournies / cage	Nbre moyen de larves parasitées (± 1C)	Fécondité moyenne (± 1C)	Éclosion moyenne (± 1C)	Taux d'éclosion des oeufs (%) (± 1C)	Nbre d'asticots ayant éclos	Taux de nymphose	Nbre de mouches ayant émergé
1	Healthy Saines	6	120	109.67 ± 3.1*	402.5 ± 14.46*	301.0 ± 17.66*	74.83 ± 4.48	284.17 ± 17.66	256.0 ± 15.96	252.67 ± 11.19
2.	Bacterial flacherie Flacherie bactérienne	6	120	45.67 ± 3.69	48.67 ± 3.3	27.33 ± 2.5	57.52 ± 5.28	10.5 ± 1.67	3.17 ± 0.54	2.63 ± 0.6
3	Viral grasserie Grasserie virale	6	120	38.67 ± 1.36	35.5 ± 2.57	14.17 ± 1.3	40.28 ± 3.46	7.33 ± ± 0.91	2.5 ± 0.22	1.83 ± 0.3
4	Muscardine	6	120	27.5 ± 2.96	23.0 ± 3.68	9.67 ± 1.94	43.07 ± 7.88	4.5 ± 0.67	0.5 ± 0.22	0.0 ± 0.0
F-value Valeur -F				160.79	562.17	249.75	-	242.37	252.7	501.42
P-value Valeur -P				3.63E-14	1.80E-19	5.16E-16	-	6.91E-16	4.60E-16	5.56E-19
CD @ 1% DC au seuil de 1 %				33.38	54.12	62.85	-	62.1	55.8	39.17

* Significant at 1%. / Significatif au seuil de 1 %.

Moreover, the pupation rate was further reduced by the maggots emerged from different diseased larvae when compared to that of the maggots emerged from healthy larvae ($f = 252.7$; $df = 23$; $p < 4.599\text{E-}19$) (Table I). Similarly, the rate of fly emergence also showed declined trend ($f = 501.42$; $df = 23$; $p < 5.563\text{E-}19$) (Table I) when compared to healthy larvae.

Preference of host location:

The interesting observation is the site selection behavior of uzi flies on host silkworm larvae. The female uzi flies, as soon as they land on the body of the silkworm larvae assessed suitability by chemoreception through touching with her mouthparts, feet and receptors in the ovipositor all over the body of her host. After that the female uzi fly preferred to lay her maximum eggs on ventro-lateral side in between the inter-segmental region (57.93%) followed by egg laying on lateral side (25.18%), on dorsal side (8.41%), on ventral side (4.45%) and on dorso-lateral side (3.97%) ($f = 46.56$; $df = 274$; $p < 0.001$) Fig. 1.

DISCUSSION

The present results indicate that, the uzi fly, *E. sorbillans* does not accept the diseased worms as its host to lay her eggs. However, only under non-availability of sufficient healthy hosts a very few eggs are laid on the diseased worms. The uzi maggots do not survive as reproductively competent flies, which emerged from silkworm larvae affected with bacterial flacherie, viral grasserie and muscardine. It appears that the uzi fly might have used olfactory cues to locate suitable host silkworm for oviposition and it identifies silkworm-rearing area up to a distance of three kilometers (Narayanaswamy, *et al.*, 1994). This indicates that, the uzi fly perhaps uses a series of physical and chemical cues to locate a suitable host. The kairomone, a volatile chemical emitted by the silkworm may play a crucial role in the host selection behavior of parasitoid uzi fly (Narayanaswamy and Devaiah, 1998). Moreover, the uzi fly might have developed adaptive behavior to avoid diseased larvae because the female fly might know that the diseased larvae greatly affect her offspring. The environmental factors on the other hand also appear to affect the host selection behavior, one such factor is mulberry plant (host of silkworm) that may predominantly affect the host selection behavior, as it is obvious that volatile chemicals emanating from the mulberry leaves are important cues in host habitat location by uzi fly as stated by Kumarvinod, *et al.*, (1992).

The results also indicate that the female uzi fly prefers to lay her maximum number of eggs on healthy silkworm larvae when compared to that of diseased ones (Table I). The experimental results supported our assumption that, the diseased silkworm larvae may release bad smell resulting from decaying of cells so that either the chemical which is responsible for attraction of uzi flies is diluted or the diseased silkworm larvae do not release chemical cues. Alternatively, the uzi fly cleverly selects its host to produce their offspring. The present study also provided a valuable insight into adoptive oviposition decision by female parasitoid to minimize potential mortality of eggs and/or newly hatched maggots. The egg hatch rate and development of hatched eggs are quite normal on the healthy silkworm but the egg hatch rate on diseased silkworm larvae and their development as maggots, pupae, and adults are almost negligible. These results indicate that the disease causing organisms of silkworm may also affect the developmental stages of uzi flies. Moreover, Divyananda (2000) has found that the uzi fly discriminates body color, texture, and growth stages of silkworm. He also showed that, the fly does not prefer to lay her eggs on moulting larvae. Further, Stireman, *et al.*, (2006) have reported that tachinids generally attack active life stages of their hosts.

The female uzi fly prefers to lay her maximum number of eggs on ventro-lateral side, in between inter-segmental region of silkworm. This may be due to the fact that ventro-lateral sides contain higher intensity of body setae and this region does not have physical contact either with substratum or mulberry leaves supplied for silkworm feeding. The uzi fly may identify this region through the contact chemo- and mechano-receptors and gets the cues, finally knows the site, the best for deposition of

her eggs. The other possibility is that, the kairomone might be released from this region and the adoptive oviposition decision makes the flies to lay her eggs on ventro-lateral side. These findings are contrary to statement of earlier workers (Kumar, *et al.*, 1993; Sengupta, 1973; Siddappaji, 1985) who have stated that the uziflies prefer to lay eggs on different regions on the silkworm body.

From the present observation, it can be concluded that the female uzifly avoids the diseased silkworms to lay her eggs by using chemoreceptors, which identify the healthy one among the groups of diseased and healthy larvae. It can be inferred from the present study that host selection by the parasitoid is not only due to the combined effect of physical and chemical cues but also activity/movement of the host silkworm larvae (Divyananda, 2000). Since the chances of survivability are very less if uzifly deposits her eggs on diseased worms, the fly does not prefer the diseased worms and cleverly selects the safer location on the host silkworm, for the production/protection of their progeny.

REFERENCE

- BERNAYS E.A., CHAPMAN R.F., 1994, Host plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, New York.
- COURTNEY S.P., KIBORA T.T., 1990, Mother does not know; selection of host by ovipositing insects. In: Bernays EA, Editors. Insect Plant Interaction. 2: 161-188. CRC Press Boca Raton, Florida, USA.
- DANDIN S.B., JAYASWAL J., GIRIDHAR K., 2003, Handbook of sericultural techniques. Central silk board, India. 195-218.
- DEVIAIAH M.C., GOVINDAN R., NARAYANASWAMY K.C., 1993, Life cycle of uzifly, *Exorista bombycis*. In: Recent advances in uzifly research. Proceedings of the National Seminar on Uzifly and its control, 1-12.
- DIVYANANDA M.T., 2000, Ovipositional preference of uzifly, *Exorista sorbillans*, on different diseased silkworms of *Bombyx mori*. M.Sc. dissertation, Bangalore University, Bangalore, India.
- KENNEDY J.S., 1965, Mechanism of host plant selection. Annals of Applied Biology 56: 317-322.
- KHAN T.A., KHANUM A., 1994, Fundamentals of biostatistics, Ukaaz publication, Hyderabad, India.
- KUMAR P., NARAYANASWAMY K.C., PRASAD K.S., DATTA R.K., 1992, Bibliography on uzifly- A parasitoid of mulberry silkworm. CSR&TI, Mysore. 64.
- KUMARVINOD., KUMAR P., DATTA R.K., 1992, Mulberry leaf as a potent source of attractant of uzifly, *Exorista bombycis*. National Seminar on Mulberry Sericulture research. CSRTI, Mysore, India, pp. 223.
- MANJUNATHA H.B., PUTTARAJU H.P., 1993, The egg of the uzifly, *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae). Applied Entomology and Zoology (Japan) 28: 574-577.
- MANJUNATHA H.B., 1993, Morphological and Cytological investigations on the uzifly, *Exorista sorbillans*. Ph.D. Thesis, Bangalore University, Bangalore, India.
- NARAYANASWAMY K.C., DEVIAIAH M.C., GOVINDAN R., 1994, Ovipositional preference and biology of uzifly, *Exorista bombycis* (Louis) on some races and hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L. Karnataka Journal of Agricultural Sciences. 7: 32-35.
- NARAYANASWAMY K.C., DEVIAIAH M.C., 1998, Silkworm uzifly, Zen publisher, Bangalore. India.
- NARAYANASWAMY, K.C., DEVIAIAH M.C., GOVINDAN, R. 1992. Ovipositional behavior of the uzifly, *Exorista bombycis*. In: Recent advances in uzifly research. Proceedings of the National Seminar on Uzifly and its control. 23-30.
- PUTTARAJU H.P., SOUMYA R.S., PRAKASH B.M., 2004, Visual response of uzifly, *Exorista bombycis* (Louis) to yellow and green light. In: Govindan R, Naika R, Sannappa B, Editors, Progress of research on disease and pest management in sericulture. 186-188. Seri-scientific publishers, Bangalore.

- SENGUPTA K., 1973, Sericultural research in India—a review. Symposium on Oriental. Entomology. Calcutta. 22-29.
- SHIVASHANKARAPPA L.H., PUTTARAJU H.P., 1995, Effect of diflubenzuran on the reproduction of the uzifly, *Exorista sorbillans* (*E. bombycis*) (Diptera: Tachinidae). Sericologia, 35: 763-766.
- SIDDAPPAJI C., 1985, Bioecology and management of the Indian uzifly, *Exorista sorbillans* (Wiedemann) (Diptera: Tachinidae) a parasite of the silkworm. Ph.D. Thesis, UAS, Bangalore. pp. 163.
- STIREMAN J.O.III., O'HARA J.E., WOOD D.M., 2006, Tachinidae: Evolution, behavior and ecology. Annual Review of Entomology, 51: 525-555.
- STIREMAN J.O. III., SINGER M.S., 2003, Determinants of parasitoid-host associations: insight of a tachinid parasitoid community. Oecologia, 135: 629-638.
- STIREMAN J.O. III., 2002, Learning in the Generalist Tachinid parasitoid *Exorista mella* Walker (Diptera: Tachinidae). Journal of insect Behavior, 15(5): 689-706.
- TANAKA C., KAINOH Y., HONDA H., 1999, Physical factors in host selection of the parasitoid fly *Exorista japonica* Townsend (Diptera: Tachinidae). Applied entomology and Zoology, 34: 91-97.

PREFERENCE D'OVIPOSITION ADAPTATIVE DE LA MOUCHE UZI *EXORISTA SORBILLANS* (DIPTERA : TACHINIDAE) SUR LE VER A SOIE

B. M. PRAKASH^{1,2}, M. T. DIVYANANDA, S. ANANDA¹, H. RAVIKUMAR¹,
B. C. KESHAVA MURTHY¹ & H. P. PUTTARAJU¹

1. Laboratory of Seribiotechnology, Department of Life Science and Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560 056, Inde.

2. Adresse actuelle: Evolutionary Biology Laboratory, Evolutionary Biology and Organismal Biology Unit, Jawaharlal Nehru Center for Scientific Research, Jakkur, Bangalore - 560064, Inde.

La mouche uzi, Exorista sorbillans, un endoparasitoïde tachinaire sévère du ver à soie, Bombyx mori L. utilise un ensemble de signaux pour trouver des larves hôtes adaptées pour sa ponte. Nous avons réalisé une expérience pour examiner la sélection de l'hôte, la localisation et le comportement de ponte de la mouche parasite. Les résultats montrent que la mouche uzi femelle non seulement préfère les larves saines pour pondre ses œufs, mais elle préfère aussi le côté ventro-latéral dans la partie intersegmentaire sur les corps des larves de l'hôte. Ces résultats suggèrent que les larves saines du ver à soie pourraient libérer un signal chimique, appelé kairomone, qui pourrait attirer la mouche uzi, ou alternativement, la préférence de ponte adaptative de la mouche uzi se produit pour minimiser le potentiel de mortalité des œufs et / ou des asticots venant d'éclore, tandis que les larves du ver à soie malades ou non saines pourraient ne pas libérer de kairomone ou la kairomone pourrait être diluée avec l'odeur des cellules en état de décomposition à cause des maladies, ce qui évite donc la ponte d'œufs sur les vers malades. De plus, le côté ventro-latéral du ver à soie Bombyx mori L. a une densité importante de poils, qui signale à la mouche uzi de pondre ses œufs ; les autres parties pourraient ne pas contenir autant de poils, en raison de la friction quand les vers à soie rampent entre les feuilles de mûrier, la mouche uzi pourrait apprendre qu'en pondant ses œufs dans la partie intersegmentaire du côté ventro-latéral, sur les larves saines, cela pourrait améliorer la survie de sa descendance. Nous présentons une discussion sur la préférence de la mouche uzi en matière de sélection et d'emplacement sur l'hôte et en matière de comportement de ponte entre les larves saines et malades.

INTRODUCTION

C'est un fait largement accepté que les insectes utilisent une hiérarchie de signaux comportementaux dans la sélection de l'hôte et cela a été reconnu en premier chez les parasitoïdes et plus tard chez les insectes phytophages (Kennedy, 1965). L'ensemble des mécanismes de sélection de l'hôte par le tachinaire comprend la localisation de l'habitat, l'emplacement sur l'hôte, l'acceptation de l'hôte, et l'utilisation de l'hôte (Tanaka et coll., 1999 ; Stireman et coll., 2006). De plus, l'insecte utilise un certain nombre de signaux sensoriels dans la sélection de l'hôte y compris des stimuli visuels, olfactifs, gustatifs et tactiles ainsi que l'humidité et l'intensité de lumière (Bernays et Chapman, 1994 ; Stireman, 2002 ; Stireman et Singer, 2003 ; Puttaraju et coll. ; 2004). Ces signaux stimulent les récepteurs, en générant un influx sensoriel et au final des réponses comportementales, puis l'insecte femelle atterrit sur l'hôte et l'évalue encore par la chimoréception, par les récepteurs de ses pieds et ses parties buccales (Courtney et Kibota, 1990). De plus, les mouches tachinaires

attaquent en général les stades actifs de leurs hôtes (Stireman, et coll., 2006). En fait, il existe probablement une interaction dynamique entre les mécanismes comportementaux d'emplacement sur l'hôte, qui déterminent quels hôtes attaquer et la sélection consécutive en fonction de l'efficacité de l'emplacement et une performance liée à l'hôte qui modèle l'évolution de ces mécanismes.

La mouche uzi *E. sorbillans*, un endoparasitoïde tachinaire du ver à soie, *Bombyx mori* L., provoque des pertes sévères de l'ordre de 15 à 20 % pour la communauté séréricole en Inde (Narayanaswamy et Devaiah, 1998). Un certain nombre de chercheurs ont travaillé sur cette menace de la mouche uzi y compris sur sa biologie (Devaiah et coll., 1992 ; Manjunatha, 1993 ; Manjunatha et Puttaraju, 1993) et sur les mesures de lutte (Shivashankarappa et Puttaraju, 1995). Auparavant, Narayanaswamy et coll., (1992) ont étudié le comportement de ponte et ils ont trouvé que les mouches uzi femelles pondent leurs œufs sur le côté dorsal, suivi par le côté latéral et ventral. Nous avons réalisé des expériences non seulement sur la sélection en matière de ponte entre des vers à soie hôtes sains et malades, mais aussi sur l'emplacement de la ponte. De telles études pourraient apporter des informations utiles pour lutter contre les mouches uzi dans les zones d'élevage du ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

Elevage de la mouche uzi :

Les mouches utilisées dans cette étude sont des individus situés entre la troisième et la quatrième génération élevés sur le ver à soie, *Bombyx mori* (Lépidoptère : Bombycidae) obtenues auprès du marché aux cocons de vers à soie de Ramanagara dans le Karnataka, en Inde, peu après qu'elles aient percé les cocons de leurs vers à soie hôtes infestés. On laisse les asticots se métamorphoser en nymphes, puis en adultes dans des cages grillagées de 35 × 35 × 35 cm. Pour s'assurer de leur virginité, on sépare immédiatement après l'émergence les mouches adultes mâles et femelles d'après les organes génitaux et d'autres caractères morphologiques spécifiques au sexe. On fournit une solution à 8 % de glucose aux mouches maintenues à 26 ± 1 °C, et dans une humidité relative de 65 à 70 % avec 12 : 12 h de conditions de lumière : d'obscurité. Un jour après l'émergence, on croise une mouche femelle avec deux mouches mâles (pour s'assurer de l'accouplement) pendant environ 24 h avec six répétitions.

Recueil du ver à soie et induction de la maladie :

On recueille des larves de ver à soie du *Bombyx mori* du troisième âge dans un centre d'élevage du ver à soie du Département de Sériculture de l'Université de Bangalore, à Bangalore. On obtient l'extrait pur et la culture des microbes provoquant la maladie, c'est-à-dire le virus de la polyédrose nucléaire (1000 virus par ml) qui provoque la grasse virale, *Bacillus satto* (800 bactéries par ml), qui provoque la flacherie bactérienne et le champignon, *Beauveria bassiana* (800 spores fongiques par ml), qui induit la muscardine blanche chez les vers à soie auprès du Département de Pathologie du Ver à Soie du *Karnataka State Sericultural Research and Development Institute*, de Bangalore. On nourrit les vers à soie à partir de feuilles de mûrier, vaporisées avec ces micro-organismes, le premier jour du quatrième âge. On élève mille larves de ver à soie, malades et saines, en laboratoire d'après la technique d'élevage standard (Dandin et coll., 2003) jusqu'au filage.

Choix de ponte des mouches uzi sur les larves de vers à soie infestées et non infestées par la maladie:

Dans chaque cage avec la mouche uzi, on place quinze larves de ver à soie au début du cinquième âge, saines et avec différentes maladies pour la ponte des mouches uzi. On remplace les larves toutes les douze heures pendant quatre jours. Immédiatement après, on sort les larves de vers à soie de chaque cage et on calcule le taux de fécondité et d'éclosion des œufs, en comptant les œufs individuels et les cicatrices noires, que l'on trouve respectivement pendant la ponte et l'éclosion sur les corps des

larves de vers à soie. On continue l'élevage des larves hôtes en laboratoire, en suivant une technique d'élevage cellulaire, pour les observations ultérieures sur le développement des asticots.

Etudes sur le comportement d'emplacement sur l'hôte :

On a entrepris cette étude pour explorer le comportement des mouches uzi concernant l'emplacement sur l'hôte (sélection du site). On prend des cages séparées avec une femelle et deux mâles pour l'accouplement et pour la ponte sur les larves de ver à soie. On utilise mille larves de ver à soie pour cette étude.

Analyse statistique :

On analyse les données obtenues d'après l'ANOVA à un facteur en fonction de la distribution de Gaussian avec Excel version 5 et d'après les méthodes décrites par Khan et Khanum (1994)

RESULTATS

Comportement de ponte des mouches uzi :

On observe en laboratoire l'oviposition de la mouche uzi, *Exorista sorbillans* sur les vers à soie infestés par différentes maladies ainsi que sur des larves de vers à soie saines. Les observations révèlent que la mouche uzi femelle préfère pondre un nombre maximum d'œufs sur les larves saines (78,97 %) puis sur des larves infestées par la flacherie (maladie bactérienne du ver à soie) (9,55 %), par la grasserie (maladie virale) (6,97 %) et par la maladie la muscardine (maladie fongique) (4,51 %) ($f = 562,17$; $df = 23$; $p < 1,799^E-19$) (Tableau I).

Taux d'éclosion et développement des œufs :

On entreprend d'étudier le taux d'éclosion des œufs sur les différentes larves de vers à soie, infestées et non infestées, pour voir quelle est l'influence des diverses maladies du ver à soie sur le taux d'éclosion des œufs de la mouche uzi et sur leur taux de développement. L'étude montre qu'on enregistre le taux maximum d'éclosion sur les larves de vers à soie saines (74,78 %), suivi par l'éclosion des œufs sur les larves infestées par la flacherie (56,15 %), par la muscardine (41,96 %) et par la grasserie (39,28 %). Cependant, entre ces deux dernières, le taux d'éclosion est presque similaire ($f = 249,75$; $df = 23$; $p < 5,159^E-16$) (Tableau I).

Le développement des asticots uzi ayant éclos est différent chez les larves saines et malades. Le développement des asticots uzi provenant d'œufs ayant éclos sur des larves de vers à soie saines est de 94,4 %, par comparaison au développement des asticots sur des larves malades, qui est de 38,48 %, 51,73 % et de 46,54 chez les larves de vers à soie infestées par la flacherie, la grasserie et la muscardine ($f = 242,37$; $df = 23$; $p < 6,907^E-16$) (Tableau I).

De plus, le taux de nymphose diminue encore pour les asticots qui émergent des différentes larves malades, par comparaison aux asticots qui émergent de larves saines, ($f = 252,7$; $df = 23$; $p < 4,599^E-19$) (Tableau I). De même, le taux d'émergence des mouches présente aussi une tendance à la baisse ($f = 501,42$; $df = 23$; $p < 5,563^E-19$) (Tableau I) par comparaison à celui sur les larves saines.

Préférence concernant l'emplacement sur l'hôte :

L'observation intéressante est le comportement des mouches uzi concernant la sélection de l'emplacement sur les larves de ver à soie hôtes. Les asticots uzi femelles, dès qu'elles atterrissent sur le corps des larves de ver à soie, évaluent la convenance par la chimio-réception en touchant tout le corps de leur hôte avec leurs parties buccales, leurs pieds et leurs récepteurs dans l'ovipositeur. Après cela, la mouche uzi femelle préfère pondre le nombre maximum d'œufs sur le côté ventro-latéral dans la partie intersegmentaire (57,93 %), suivi par la ponte des œufs sur le côté latéral (25,18 %), sur le côté ventral (4,45 %) et sur le côté dorso-latéral (3,97 %) ($f = 46,56$; $df = 274$; $p < 0,001$) Fig. 1.

DISCUSSION

Les résultats actuels indiquent que la mouche uzi, *E. sorbillans*, n'accepte pas les vers malades comme hôte pour pondre ses œufs. Cependant, c'est seulement lorsqu'il n'y a pas assez d'hôtes sains disponibles, que quelques œufs sont pondus sur des vers malades. Les asticots uzi qui émergent de larves de vers à soie affectées par la flacherie bactérienne, la grasserie virale, et la muscardine, ne survivent pas en tant que mouches compétentes pour se reproduire. Il apparaît que la mouche uzi pourrait avoir utilisé des signaux olfactifs pour localiser un ver à soie hôte convenable pour la ponte et elle identifie une zone d'élevage du ver à soie jusqu'à une distance de trois kilomètres (Narayanaswamy et coll., 1994). Cela indique que la mouche uzi utilise une série de signaux physiques et chimiques pour localiser un hôte qui convient. La kairomone, un produit chimique volatil émis par le ver à soie pourrait jouer un rôle crucial dans le comportement de sélection de la mouche uzi parasitoïde (Narayanaswamy et Devaiah, 1998). Par ailleurs, la mouche uzi pourrait avoir mis au point un comportement d'adaptation pour éviter les larves malades, qui ont un effet très négatif sur sa descendance. D'autre part, les facteurs environnementaux semblent aussi affecter le comportement de sélection de l'hôte, un de ces facteurs est le plant de mûrier (hôte du ver à soie), puisqu'il est évident que les substances chimiques volatiles qui émanent des feuilles de mûrier sont des signaux importants dans la localisation de l'habitat de l'hôte par la mouche uzi comme l'ont précisé Kumarvinod et coll., (1992).

Les résultats indiquent aussi que la mouche uzi préfère pondre le nombre maximum d'œufs sur des larves saines du ver à soie par comparaison aux larves malades (Tableau I). Les résultats de l'expérience confirment notre hypothèse selon laquelle les larves de vers à soie malades pourraient libérer une mauvaise odeur provenant des cellules en décomposition, de sorte que soit la substance chimiqu qui est responsable de l'attrance des mouches uzi est diluée soit les larves de ver à soie malades ne libèrent pas les signaux chimiques. Alternativement, la mouche uzi sélectionne intelligemment son hôte pour produire sa descendance. Cette étude apporte aussi un aperçu précieux sur la décision de ponte par le parasitoïde femelle, pour minimiser la mortalité potentielle des œufs et / ou des larves venant d'éclore. Le taux d'éclosion des œufs et le développement des œufs éclos est assez normal sur le ver à soie sain, mais le taux d'éclosion des œufs sur les larves de ver à soie malades et leur développement ultérieur en asticots, nymphes et adultes est presque négligeable. Ces résultats indiquent que les organismes qui provoquent la maladie chez le ver à soie pourraient aussi affecter les stades de développement des mouches uzi. De plus, Divyananda (2000) a constaté que la mouche uzi établit une distinction sur la couleur du corps, la texture et les stades de croissance du ver à soie. Il a aussi montré que la mouche préfère ne pas pondre ses œufs sur les larves qui muent. Stireman et coll., (2006) ont aussi rapporté que les tachinaires attaquent généralement les stades de vie actifs de leurs hôtes.

La mouche uzi femelle préfère pondre le nombre maximum d'œufs sur le côté ventro-latéral, dans la zone intersegmentale du ver à soie. Cela pourrait être dû au fait que les côtés ventro-latéraux contiennent une densité plus importante de soies corporelles et que cette zone n'a pas de contact physique soit avec la couche inférieure ou avec les feuilles de mûrier, avec lesquelles le ver à soie se nourrit. La mouche uzi pourrait identifier cette zone par les chimio et mécano récepteurs de contact, obtenir les signaux et finalement connaître le meilleur site pour déposer ses œufs. L'autre possibilité est que la kairomone pourrait être libérée de cette zone et que l'adoption de la décision de la ponte fait pondre les mouches sur le côté ventro-latéral. Ces résultats sont contraires aux conclusions précédentes de chercheurs (Kumar et coll., 1993 ; Sengupta, 1973 ; Siddappaji, 1985) qui ont affirmé que les mouches uzi pondent leurs œufs sur différentes zones corporelles du ver à soie.

D'après cette étude, on peut conclure que la mouche uzi femelle évite les vers à soie malades pour pondre ses œufs en utilisant des chimiorécepteurs, qui identifient les larves saines parmi les groupes de larves malades et saines. On peut en déduire que la sélection de l'hôte par le parasitoïde est non seulement due à l'effet combiné de signaux physiques et chimiques mais aussi à l'activité /

au mouvement des larves de vers à soie (Divyananda, 2000). Puisque les chances de survie sont beaucoup moins importantes si la mouche uzi dépose ses œufs sur des vers malades, la mouche sélectionne l'endroit le plus sûr sur le ver à soie hôte, pour la production / la protection de sa descendance.

RELATIVE TOLERANCE OF CERTAIN POLYVOLTINE SILKWORM BREEDS OF *BOMBYX MORI* L. TO NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS AND DEVELOPMENT OF BmNPV TOLERANT FOUNDATION CROSSES

S. D. SHARMA*, K. CHANDRASEKHARAN, RAVINDRA SINGH, D. RAGHAVENDRA RAO, B. NATARAJU, A. K. PALIT & S. B. DANDIN

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

Thirty four polyvoltine silkworm were screened to find out their relative susceptibility/ tolerance level against BmNPV. Out of these 34 breeds, 9 breeds v.i.z. 96C, Mysore Princes, Moria, TN White, BL36, BL37, Nistari, GNP and MDR showing less than 30% mortality due to grasserie were short listed as comparatively tolerant breeds. Breeds showing more than 51% mortality due to grasserie were categorized as susceptible breeds and among them BL 45 was showing the highest mortality (98.66%). Among the short listed nine breeds, Nistari had shown highest LC₅₀ value of $10^{6.266}$ and TN White the least LC₅₀ value ($10^{6.924}$). Based on the relative tolerance towards BmNPV and also their economic characters, four breeds v.i.z. 96 C, BL 37, GNP and MDR were used for making eight foundation crosses with six other productive polyvoltine breeds and these foundation crosses were screened against BmNPV to find out their relative tolerance. The lowest incidence of grasserie (4 %) was recorded in BL 67 × BL 37 followed by BL 65 × MDR (14%), BL 45 × BL 37 (16%) and MDR × BL 67 (17 %). The highest mortality (31.66%) was observed in 96 C × MDR followed by BL 69 × MDR (29 %) and BL 68 × GNP (27 %). Distinct superiority of these crosses over their parental breeds in terms of their relative tolerance to BmNPV was confirmed indicating genetic basis of tolerance against BmNPV in silkworm.

Keywords: Silkworm, polyvoltine, BmNPV, susceptibility.

INTRODUCTION

Domestication of the mulberry silkworm *Bombyx mori* L. has rendered it susceptible to a number of diseases caused by different pathogenic agents such as viruses, bacteria, fungus and microsporidia. Approximately 25-35% of the cocoon crops are lost due to silkworm diseases every year in India. Among all the diseases, viral diseases are most abundant and are a major cause of worry to sericulturists (Samson *et al.*, 1990; Subbarao *et al.*, 1991; Sivaprakasam & Rabindra, 1995). Nuclear Polyhedrosis alone accounts for 43 to 50% crop loss (Nataraju *et al.*, 1998). The disease is caused by an occluded baculovirus, *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) and is prevalent during all seasons. However its incidence is severe during summer followed by rainy season (Selvakumar *et al.*, 2002). High temperature with high humidity prevalent in tropical countries like India is highly conducive for the grasserie disease (Subbarao *et al.*, 1991). There are different prophylactic measures for controlling the disease but due to the socioeconomic conditions prevailing

* Address for correspondence

in India, most of the sericulturists are not following the disease control technology in totality. This leads to heavy crop loss and reduces the income level of the farmers. Hence there is a need for an alternate strategy for controlling the grasserie disease in the field. In this connection, the inherent genetic capacity of the silkworm to resist the pathogens are required to be explored and breeds comparatively tolerant to BmNPV should be developed. Use of disease resistant/tolerant varieties should be a step further in the direction of more effective disease prevention. Before initiation of any breeding programme for disease resistance/tolerance, the tolerance level of the available breeding resource materials should be explored. The present study was undertaken to screen the available polyvoltine breeds for their relative tolerance to BmNPV and to identify and utilize the comparatively tolerant polyvoltine breeds for evolving certain foundation crosses for use in future breeding programmes.

MATERIALS AND METHODS

Screening of polyvoltine breeds to BmNPV:

Thirty four polyvoltine breeds *v.i.z.*, BL67, BL69, 96A, 96C, 96E, 96H, 9LMO, PM, BL61, BL62, Kollegal Jawan, Mysore Princes, BL30, BL35, BL44, Moria, TN White, PH12, BL23, BL24, BL43, BL45, BL65, BL68, BL36, BL37, Nistari, TN, NK4, RD1, GNP, MDR, MR1 and Cambodge obtained from the Polyvoltine Breeding Laboratory of Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore were utilized for this study. The silkworm breeds were screened for their relative tolerance towards BmNPV as per the method described by Eguchi *et al.*, (1986) after suitable modifications.

Preparation of BmNPV inoculum:

BmNPV polyhedra were extracted from the haemolymph of the infected silkworm. The haemolymph was collected by cutting the tip of proleg of silkworm and purified by gradient centrifugation method (Sugimori *et al.*, 1990). The concentration of the pathogen in the stock inoculum was determined by using haemocytometer and the required concentration was prepared by suitably diluting the stock inoculum.

Inoculation of BmNPV to silkworm:

The larvae were per-orally inoculated immediately after second moult with 1×10^7 Polyhedral Occlusion Bodies (POB) /ml @ 1 ml pathogen suspension for 100 larvae. Mulberry leaves were cut to make discs of 7.5 cm diameter and 0.5 ml of the inoculum was smeared on each leaf disc. Two such pathogen smeared discs were provided to 100 larvae. The inoculum was stirred using a cyclomixer before each smearing. For each breed, three replications of 100 larvae were maintained. Normal feeding was given to the inoculated batches after 12 hours after ensuring that the smeared leaf was fully consumed. Further rearing was carried out as per Krishnaswami (1978). Incidence of Nuclear Polyhedrosis was recorded daily for 10 days post inoculation.

Determination of LC₅₀ value of the selected breeds:

Based on the disease incidence recorded and the level of tolerance against BmNPV, nine breeds *v.i.z.*, 96C, Mysore Princes, Moria, TN White, BL36, BL37, GNP, MDR and Nistari were selected. These selected breeds were inoculated with five progressive doses of BmNPV inoculums *v.i.z.* 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 and 1×10^8 POB/ml and Nuclear Polyhedrosis recorded for ten days post inoculation. For each breed LC₅₀ value was calculated using Probit analysis (Finney 1971) using Indostat software.

Table I. Screening of different polyvoltine breeds of silkworm against BmNPV.**Tableau I. Evaluation de différentes lignées polyvoltines du ver à soie contre BmNPV.**

Sl. No.	Name of breed	Grasserie incidence	Susceptibility status	Sl. No.	Name of Breed	Grasserie incidence	Susceptibility status
<i>No. de série</i>	<i>Nom de la lignée</i>	<i>Incidence de la grasserie (%)</i>	<i>Etat de sensibilité</i>	<i>No. de série</i>	<i>Nom de la lignée</i>	<i>Incidence de la grasserie (%)</i>	<i>Etat de sensibilité</i>
1	BL 67	68	Susceptible	18	PH 12	71	Susceptible
2	BL 69	72	Sensible	19	BL 23	59	Susceptible
3	96 A	54	Sensible	20	BL 24	55	Sensible
4	96 C	30	Susceptible	21	BL 43	55	Susceptible
5	96 E	76	Tolérant	22	BL 45	99	Sensible
6	96 H	67	Susceptible	23	BL 65	80	Susceptible
7	9 LMO	22	Sensible	24	BL 68	65	Sensible
8	PM	40	Tolérant	25	BL 36	27	Susceptible
9	BL 61	72	Medium	26	BL 37	21	Tolérant
10	BL 62	70	Moyen	27	Nistari	09	Tolérant
11	Kollegal jawan	69	Susceptible	28	TN	69	Tolérant
12	Mysore Princes	29	Sensible	29	NK 4	59	Susceptible
13	BL 30	62	Tolérant	30	RD 1	53	Sensible
14	BL 35	78	Susceptible	31	GNP	12	Susceptible
15	BL 44	71	Sensible	32	MDR	20	Tolérant
16	Moria	30	Susceptible	33	MR 1	88	Tolérant
17	TN White	30	Tolérant	34	Cambodge	66	Susceptible
			Tolérant				Sensible

CD @ 5%: 5.75; SE $\pm$ 2.04

0-30% = Tolerant / Tolérant;

31-50% = Medium / Moyen ;

51% and above = Susceptible / 51 % et au dessus = Sensible.

Screening of the foundation crosses:

Four breeds *v.i.z.* BL 37, GNP, 96 C and MDR from the short listed 9 breeds were used for making eight foundation crosses with six other productive polyvoltine breeds *i. e.* BL 45, BL 62, BL 65, BL 67, BL 68 and BL 69. The relative tolerance of these foundation crosses to BmNPV were also studied after challenging them with fixed dose of BmNPV (1×10^7 POB/ml) and the incidence of Nuclear Polyhedrosis was recorded.

RESULTS

Percent incidence of Nuclear Polyhedrosis in 34 polyvoltine breeds after *per os* inoculation of BmNPV is presented in Table I. Data shows that breeds such as Nistari (8%), GNP (12%), MDR (20%), 9 LMO (22%), BL 36 (27%), BL 37 (22%), Mysore princes (29%), Moria, TN White and 96 C (30%) have shown comparatively low level of Nuclear Polyhedrosis incidence at an inoculum dose of 1×10^7 POB/ml thereby suggesting that these breeds are comparatively tolerant to BmNPV when compared to other breeds tested. BL 45 was found to be most susceptible by recording 99% incidence of Nuclear Polyhedrosis followed by BL 65 (80%), MR 1 (88%), BL 35 (78%) and 96 E (76%). Only PM (40%) was found to be medium for the incidence of Nuclear Polyhedrosis.

Table II. Mortality due to Nuclear Polyhedrosis in the eight selected polyvoltine breeds after inoculating with different concentrations of BmNPV.

Tableau II. Mortalité due à la polyédrose nucléaire chez les huit lignées polyvoltines sélectionnées après l'inoculation avec différentes concentrations de BmNPV.

Breed	BmNPV Inoculum load (POB/ml)				
Lignée	Dose d'inoculum BmNPV (POB / ml)				
	1×10^6	5×10^6	1×10^7	5×10^7	1×10^8
1. 96C	6	15	25	40	72
2. Mysore princes	4	12	26	34	60
3. Moria	3	9	24	31	69
4. TN White	10	18	37	67	100
5. BL 36	4	15	24	39	71
6. BL 37	1	9	18	29	56
7. GNP	4	12	11	48	82
8. MDR	1	7	22	38	71

Based on the percent incidence of Nuclear Polyhedrosis, eight breeds *v.i.z.*, 96C, Mysore princes, Moria, TN White, BL 36, BL37, GNP, 9LMO and MDR were selected which exhibited comparatively high degree of tolerance to BmNP. The mortality after inoculating five progressive doses of BmNPV inoculum to these breeds was recorded which is given in Table II. The three low doses resulted in good survival rate in all these nine breeds which ranged from 62.67 to 99 %.

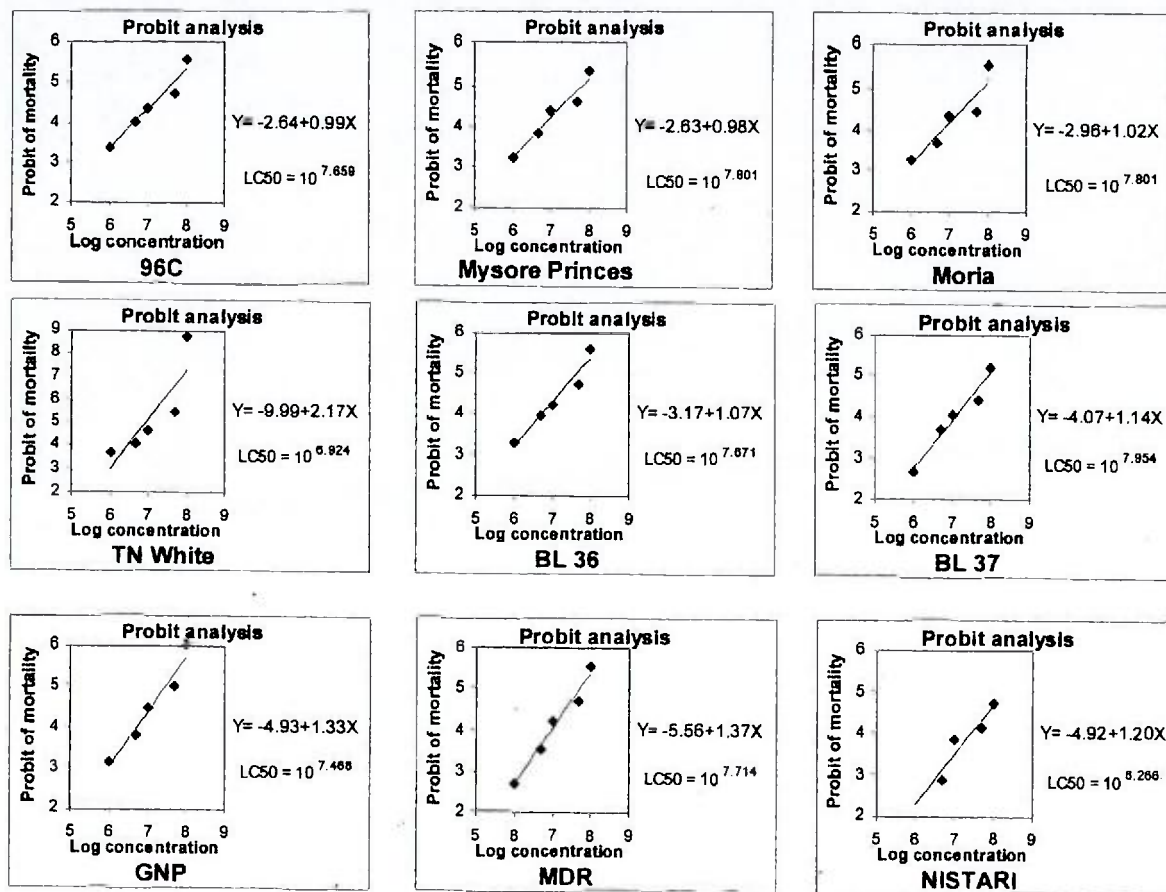


Fig. 1. Probit analysis of the mortality data of breeds at different inoculum doses.

Fig. 1. Analyse probit des données sur la mortalité des lignées avec différentes doses d'inoculum.

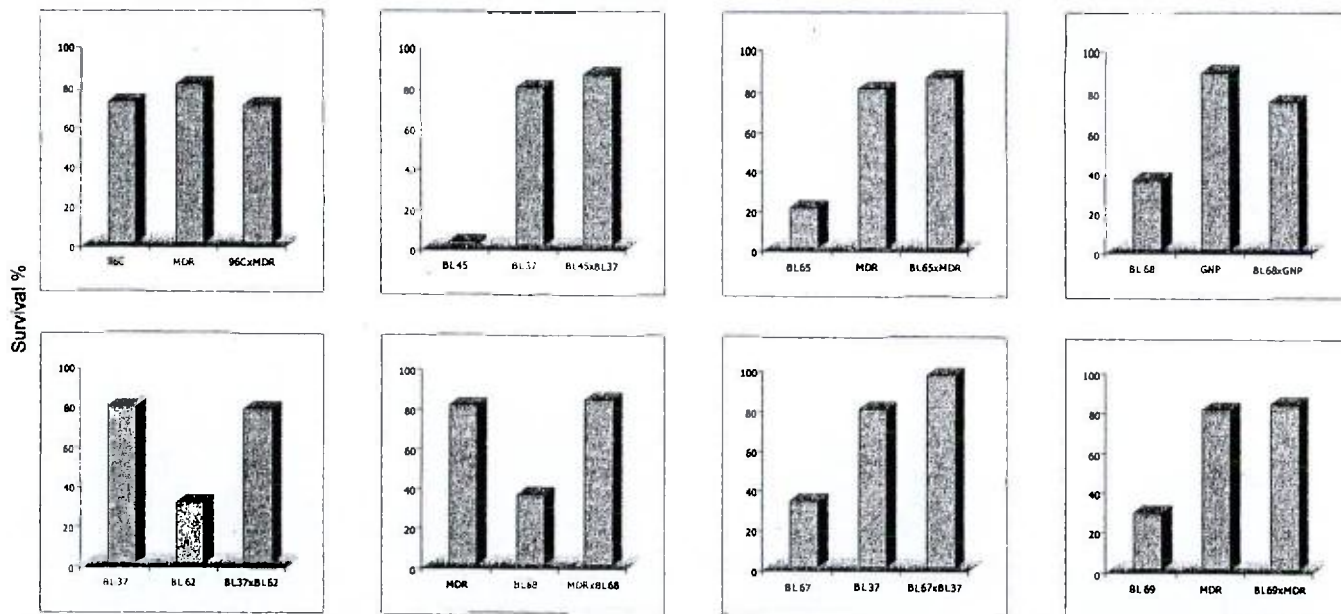


Fig. 2. Survivability status of eight foundation crosses vis-à-vis their parental breeds after inoculating with BmNPV.
Survival % / Pourcentage de survie.

Fig. 2. Etat de survie de huit croisements de base par rapport à leurs lignées parentales après l'inoculation avec BmNPV.

However, at 5×10^7 inoculum dose the survival rate ranged between 33% (TN White) to 70.67% (BL37). At 1×10^8 inoculum dose there was no survival in TN White while BL 37 showed highest survival (44%) followed by Mysore princes (39.67%). The results of probit analysis to determine their LC_{50} values are depicted in fig. 1. The highest LC_{50} value of $10^{8.266}$ POB/ml was recorded in Nistari followed by BL 37 ($10^{7.954}$ POB/ml) indicating comparatively high level of tolerance. Mysore Princes and Moria each showed $10^{7.801}$ as LC_{50} value. The lowest LC_{50} value was recorded in TN White ($10^{6.924}$) among the eight selected breeds.

Table III. Mortality due to Nuclear Polyhedrosis in the foundations crosses after BmNPV inoculation.

Tableau III. Mortalité due à la polyédrose nucléaire dans les croisements de base après l'inoculation de BmNPV.

Sl. No	Foundation crosses	Grasserie incidence
No. de série	Croisements de base	Incidence de la grasserie (%)
1	96C × MDR	31
2	BL45 × BL37	15
3	BL65 × MDR	15
4	BL68 × GNP	26
5	BL37 × BL62	23
6	MDR × BL68	18
7	BL67 × BL37	4
8	BL69 × MDR	28

CD at 5% 4.32; SE $\pm$ 1.42

Based on the relative tolerance towards BmNPV coupled with their economic characters, four breeds *v.i. z.* BL 37, GNP, 96 C and MDR were used for making eight foundation crosses with six other productive Polyvoltine breeds. These foundation crosses were screened with BmNPV to find out their tolerance level and the results are presented in Table III. The lowest incidence of grasserie (4 %) was recorded in BL 67 × BL 37 followed by BL 65 × MDR (15%), BL 45 × BL 37 (15%) and MDR × BL 67 (18%). The highest mortality (31%) was observed in 96 C × MDR followed by BL 69 × MDR (28 %) and BL 68 × GNP (26 %). The survivability of the foundation crosses after inoculating with BmNPV *vis-a-vis* their parental breeds is indicated in fig. 2. It shows a distinct superiority of the resultant crosses over their parental breeds in terms of their relative tolerance to BmNPV.

DISCUSSION

Though bivoltine sericulture is essential and important for the production of international quality silk, bulk of the silk produced in India comes from the commercial rearings of Polyvoltine $\times$ Bivoltine hybrids. Polyvoltine breeds, therefore plays a major role in sericulture industry and needs adequate attention. To improve the productivity in polyvoltine breeds productivity traits and disease tolerance should be suitably combined by the silkworm breeders so as to exploit it at field level.

The present study indicated a wide variation in the incidence of grasserie (9-99 %) in different breeds after challenging with uniform dose of BmNPV inoculum. It is clear that different races differ greatly in their relative tolerance to the pathogen. This inherent variation in the tolerance level against BmNPV could therefore be exploited in developing grasserie resistant/tolerant breeds for commercial exploitation. This study also establishes that tolerant breeds do exist among polyvoltine breeds along with susceptible and medium tolerant ones and there is ample scope for utilizing this BmNPV tolerant polyvoltine breeds in developing grasserie resistant/tolerant breeds with superior economic characters. Similar results were obtained by Aratake (1973). The variability observed among the different breeds indicate that there may be different genetic mechanisms responsible for their tolerance to BmNPV. Zhiqi Meng (1982) reported that the variation among the different silkworm breeds towards BmNPV tolerance is regulated by a pair of major dominant genes and some minor effect genes and that the resistance of F₁ offsprings surpassed that of higher parents and demonstrated strong heterosis. Bivoltine silkworms are reportedly more susceptible to BmNPV than polyvoltine breeds (Liu Shixian, 1984; Sivaprakasam and Rabindra, 1995). Ratna Sen *et al.* (1997) observed that the non diapausing stocks of silkworm, *Bombyx mori*, L. are more tolerant compared to the diapausing stocks. The results of the present study also indicate that the resultant crosses are superior over their parental breeds in terms of their relative tolerance to BmNPV suggesting ample possibilities that the tolerance to BmNPV is genetically passed to the next generation.

To develop Nuclear Polyhedrosis resistant/tolerant breeds, it is essential that the genetic mechanism underlying the tolerance in particular breed or stock should be properly understood so as to effectively transgress the tolerance in to a productive breed to enhance the productivity level of silkworm cocoon crop at farmers' level by ensuring better survival of silkworm during rearing. (Ratna Sen, *et al.* 1997).

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to all the staff of Silkworm Pathology laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore for their valuable help during the course of the study.

REFERENCES

- ARATAKE Y. (1973) Strain difference of the silkworm, *Bombyx mori* L. in the resistance to nuclear polyhedrosis virus. J. Seric. Sci. Jpn. 42(3): 230- 238.
- EGUCHI R., FURUTA Y. & NINAKI O. (1986) Dominant non susceptibility to denso nucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci. Jpn. 55(2): 177- 178.
- FINNEY D. J. (1971) Probit analysis, Third edition, S. chand and Co. New Delhi, p 333.
- KRISHNASWAMY S. (1978) New technology of silkworm rearing. Bulletin No.2., Central Sericultural research and Training Institute. Mysore, India.
- LIU SHIXIAN (1984) Identification on the resistance of silkworm, *Bombyx mori* L races to six types of silkworm diseases. Sericologia, 24(3): 377 – 382.
- 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(2):154-158.

- RATNA SEN, PATNAIK A. K. & MAHESHWARI M. & DATTA, R.K. (1997) Susceptibility status of the silkworm (*Bombyx mori*) germplasm stocks in India to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. Indian J. Seric., 31(1): 51-54.
- SAMSON M.V.; BAIG M.; SHARMA S. D.; BALAVENKATASUBBAIAH M.; SASIDHARAN, T. O. & JOLLY M. S. (1990) Survey on the relative incidence of silkworm diseases in Karnataka, India. Indian J. Seric., 29(2): 248-254.
- SELVAKUMAR T.; NATARAJU B.; BALAVENKATASUBBAIAH M.; SIVAPRASAD V.; BAIG M.; VIRENDRAKUMAR; SHARMA S.D.; THIAGARAJAN, V. & DATTA R. K. (2002) A report on the prevalence of silkworm diseases and estimated crop loss. Proceedings of National Conference on Strategies for Sericulture Research and Development. November, 16-18, 2000. (ed.) S. B. Dandin and V. P Gupta, CSR&TI., Mysore, pp.354-357.
- SIVAPRAKASAM N. & RABINDRA R. J. (1995) Incidence of grasserie in silkworm *Bombyx mori* L. in selected districts of Tamil Nadu. Indian J. Seric., 34(2):100-104.
- SUBBARAO G., CHANDRA A. K. & BHATTACHARYA J.(1991) Incidence of crop loss from adopted rearers level in West Bengal due to silkworm diseases. Indian J. Seric., 30(2):167
- SUGIMORI H., NAGAMINE T. & KOBAYASHI M. (1990) Analysis of structural polypeptides of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) Nuclear polyhedrosis virus. Appl. Entomol. Zool., 25(1):67-77.
- ZHIQI MENG (1982) Heredity of resistance to BmNPV disease in silkworm. Chinese Journal of Sericultural Science, 8(8):133-138.

TOLERANCE RELATIVE DE CERTAINES LIGNEES DE VERS A SOIE POLYVOLTINES DE *BOMBYX MORI* L. AU VIRUS DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE ET MISE AU POINT DE CROISEMENTS DE BASE TOLERANT A BmNPV

S. D. SHARMA*, K. CHANSEKHARAN, RAVINDRA SINGH, D. RAGHAVENDRA RAO, B. NATARAJU, A. K. PALIT & S. B. DANDIN

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore – 570 008, Inde. Tel. No. 0091-0821-2900571, Fax : 0091 – 0821 236 845, Email : sdsharma_csb@yahoo.co.in

On a évalué 34 lignées de vers à soie polyvoltins pour déterminer leur niveau de sensibilité / tolérance relative à BmNPV. Sur ces 34 lignées, on a sélectionné 9 lignées c'est-à-dire 96C, Mysore Princes, Moria, TN White, BL36, BL37, Nistari, GNP et MDR, qui présentent moins de 30 % de mortalité due à la grasserie comme des lignées relativement tolérantes. On classe les lignées qui présentent plus de 51 % de mortalité à cause de la grasserie comme des lignées sensibles et parmi elles BL 45, présente la mortalité la plus élevée (98,66 %). Parmi les neuf lignées sélectionnées, Nistari présente la valeur LC₅₀ la plus élevée de $10^{6,266}$ et TN White la valeur LC₅₀ la moins élevée ($10^{6,924}$). D'après la tolérance relative envers BmNPV et aussi leurs caractères économiques, on utilise quatre lignées c'est-à-dire 96 C, BL 37, GNP et MDR pour réaliser huit croisements de base avec six autres lignées polyvoltines productives et on évalue ces croisements de base contre BmNPV pour déterminer leur tolérance relative. On enregistre l'incidence de la grasserie la plus faible (4 %) chez BL 67 × BL 37 suivi par BL 65 × MDR (14 %), BL 45 × BL 37 (16 %) et MDR × BL 67 (17 %). On observe la mortalité la plus élevée (31,66 %) chez 96 C × MDR, suivi par BL 69 × MDR (29 %) et BL68 × GNP (27 %). La supériorité distincte de ces croisements par rapport à leurs lignées parentales est confirmée, ce qui indique une base génétique de tolérance à BmNPV chez le ver à soie.

INTRODUCTION

La domestication du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. l'a rendu sensible à un certain nombre de maladies provoquées par différents agents pathogènes, tels que les virus, les bactéries, les champignons et les microsporidies. Chaque année en Inde, approximativement 25 à 35 % des récoltes de cocons sont perdues, à cause des maladies des vers à soie. Parmi toutes les maladies, les maladies virales sont les plus abondantes et sont une cause principale d'inquiétude chez les sériciculteurs (Samson et coll., 1990 ; Subbarao et coll., 1991 ; Sivaprakasam et Rabindra , 1995). La polyédrose nucléaire représente à elle seule environ 43 à 50 % des pertes de récoltes (Nataraju et coll., 1998). La maladie est provoquée par un baculovirus occlus, le virus de la Polyédrose Nucléaire de *Bombyx mori* (BmNPV) et est répandue pendant toutes les saisons. Cependant, son incidence est plus sévère pendant l'été puis pendant la saison des pluies (Selvakumar et coll., 2002). La température élevée et l'humidité élevée, présentes dans les pays tropicaux comme l'Inde, sont très propices à la grasserie (Subbarao et coll., 1991). Il existe différentes mesures prophylactiques pour lutter contre la maladie mais compte tenu des conditions socio-économiques qui dominent en Inde, la plupart des sériciculteurs ne suivent

* Auteur auquel adresser la correspondance.

pas totalement la technologie de lutte contre la maladie. Cela entraîne des pertes importantes de récoltes et diminue le niveau de revenus des fermiers. On a donc besoin d'une stratégie alternative pour lutter contre la grasserie sur le terrain. A cet égard, il faut explorer la capacité génétique inhérente du ver à soie à résister aux pathogènes et il faudrait mettre au point des lignées comparativement tolérantes à BmNPV. L'utilisation de variétés résistantes / tolérantes devrait être une étape supplémentaire pour aboutir à une prévention plus efficace de la maladie. Avant le début d'un programme de lignage de résistance / tolérance à la maladie, il faudrait explorer le niveau de tolérance des ressources de lignage disponibles. Cette étude a été entreprise pour évaluer les lignées polyvoltines disponibles, par rapport à leur tolérance relative à BmNPV, afin d'utiliser les lignées polyvoltines comparativement tolérantes pour mettre au point certains croisements de base à utiliser dans de futurs programmes de lignage.

MATERIELS ET METHODES

Evaluation de lignées polyvoltines par rapport à BmNPV :

Pour cette étude, nous avons utilisé trente quatre lignées polyvoltines, c'est-à-dire BL67, BL69, 96A, 96C, 96^E, 96H, 9LMO, PM, BL61, BL62, Kollegal Jawan, Mysore Princes, BL30, BL35, BL44, Moria, TN White, PH12, BL23, BL24, BL43, BL45, BL65, BL68, BL36, BL37, Nistari, TN, NK4, RD1, GNP, MDR, MR1 et Cambodge obtenues auprès du Laboratoire de Breeding Polyvoltin du *Central Sericultural Research and Training Institute*, de Mysore. On évalue les lignées de ver à soie par rapport à leur tolérance relative à BmNPV, d'après la méthode décrite par Eguchi et coll., (1986) après les modifications adaptées.

Préparation de l'inoculum BmNPV :

On extrait les polyèdres de BmNPV de l'hémolymphe de vers à soie infestés. On recueille l'hémolymphe en coupant l'extrémité de la patte avant du ver à soie et on la purifie par la méthode de centrifugation par gradient (Sugimori et coll., 1990). On détermine la concentration du pathogène dans l'inoculum souche en utilisant un hémocytomètre et on prépare la concentration requise en diluant l'inoculum souche.

Inoculation de BmNPV chez le ver à soie :

On inocule les larves *per os* immédiatement après la deuxième mue avec 1×10^7 corps d'occlusion polyédraux (POB) / ml à raison d'un ml de suspension du pathogène pour 100 larves. On coupe les feuilles de mûrier pour faire des disques de 7,5 cm de diamètre et on étale 0,5 ml d'inoculum sur chaque disque de feuille. On donne deux disques, enduits de cette manière avec les pathogènes, à 100 larves. On mélange l'inoculum en utilisant un cyclomixeur avant chaque étalage. Pour chaque lignée, on maintient trois répétitions de 100 larves. On alimente normalement les lots inoculés au bout de 12 heures, après s'être assuré que la feuille enduite a été complètement consommée. On procède à la suite de l'élevage d'après Krishnaswami (1978). On enregistre l'incidence de la polyédrose nucléaire quotidiennement pendant 10 jours après l'inoculation.

Détermination de la valeur LC50 des lignées sélectionnées :

D'après l'incidence de la maladie enregistrée et du niveau de tolérance à BmNPV, on sélectionne neuf lignées, c'est-à-dire 96C, Mysore Princes, Moria, TN White, BL36, BL37, GNP, MDR et Nistari. On inocule ces lignées sélectionnées avec cinq doses progressives d'inoculum BmNPV, c'est-à-dire 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 et 1×10^8 POB / ml et on enregistre la polyédrose nucléaire au bout de dix jours après l'inoculation. Pour chaque lignée, on calcule la valeur LC50 par l'analyse Probit (Finney, 1971) en utilisant le logiciel Indostat.

Evaluation des croisements de base :

On utilise quatre lignées, c'est-à-dire BL37, GNP, 96C et MDR sur les 9 lignées sélectionnées pour faire les huit croisements de base avec six autres lignées polyvoltines produites, c'est-à-dire BL45, BL 62, BL65, BL67, BL68 et BL69. On a aussi étudié la tolérance relative de ces croisements de base à BmNPV après une attaque avec une dose fixe de BmNPV (1×10^7 POB / ml) et on a enregistré l'incidence de la polyédrose nucléaire.

RESULTATS

L'incidence de la polyédrose nucléaire en pourcentage chez 34 lignées polyvoltines après l'inoculation *per os* de BmNPV est présentée dans le Tableau I. Les données montrent que les lignées telles que Nistari (8 %), GNP (12 %), MDR (20 %), 9 LMO (22 %), BL36 (27 %), BL 37 (22 %), Mysore Princes (29 %), Moria, TN White et 96 C (30 %) présentent un niveau comparativement bas d'incidence de Polyédrose Nucléaire avec une dose d'inoculum de 1×10^7 POB / ml, ce qui suggère donc que ces lignées sont tolérantes à BmNPV quand on les compare à d'autres lignées testées. BL45 s'avère plus sensible en enregistrant une incidence de Polyédrose nucléaire de 99 %, suivie par BL 65 (80 %), MR 1 (88 %), BL 35 (78 %) et 96 E (76 %). Il n'y a que PM que l'on trouve moyenne (40 %) pour l'incidence de la Polyédrose Nucléaire.

D'après l'incidence de Polyédrose Nucléaire en pourcentage, on sélectionne huit lignées, c'est-à-dire, 96 C, Mysore princes, Moria, TN White, BL36, BL37, GNP, 9 LMO et MDR, qui présentent un degré comparativement élevé de tolérance à BmNPV. On enregistre leur mortalité, qui est présentée dans le Tableau II, après l'inoculation de cinq doses progressives d'inoculum BmNPV. Les trois doses faibles donnent un bon taux de survie, compris entre 62,67 et 99 % chez ces neuf lignées,

Cependant, à 5×10^7 de dose d'inoculum, le taux de survie est compris entre 33 % (TN white) et 70,67 % (BL37). A une dose d'inoculum de 1×10^8 , il n'y a pas de survie chez TN White tandis que BL 37 présente la survie la plus élevée (44 %), suivie par Mysore princes (39,67 %). Les résultats de l'analyse Probit pour déterminer leurs valeurs LC_{50} sont présentés dans la fig. 1. On enregistre la valeur LC_{50} la plus élevée de $10^{8,266}$ chez Nistari, suivi par BL 37 ($10^{7,954}$ POB / ml), ce qui indique un niveau élevé de tolérance. Mysore Princes et Moria présentent chacune une valeur LC_{50} de $10^{7,801}$. On enregistre la valeur LC_{50} la plus faible chez TN White ($10^{6,924}$), parmi les huit lignées sélectionnées.

D'après leur tolérance relative à BmNPV associée à leurs caractères économiques, on utilise quatre lignées, c'est-à-dire BL37, GNP, 96C et MDR pour réaliser huit croisements de base avec six autres lignées polyvoltines productives. On évalue ces croisements de base par rapport à BmNPV pour trouver leur niveau de tolérance et les résultats sont présentés dans le Tableau III. On enregistre l'incidence la plus faible de grasserie (4 %) chez BL67 $\times$ BL37, suivi par BL 65 $\times$ MDR (15 %), BL 45 $\times$ BL 37 (15 %) et MDR $\times$ BL67 (18 %). On observe la mortalité la plus élevée (31 %) chez 96 C $\times$ MDR suivi par BL69 $\times$ MDR (28 %) et BL68 $\times$ GNP (26 %). La capacité de survie des croisements de base après l'inoculation avec BmNPV par rapport à leurs lignées parentales est présentée dans la fig. 2. Elle montre une supériorité des croisements obtenus par rapport à leurs lignées parentales, en termes de tolérance relative envers BmNP.

DISCUSSION

Bien que la sériciculture bivoltine soit essentielle et importante pour la production d'une soie de qualité internationale, la majorité de la soie produite en Inde provient d'élevages commerciaux d'hybrides polyvoltin $\times$ bivoltin. Les lignées polyvoltines jouent donc un rôle principal dans l'industrie séricicole et nécessitent une attention appropriée. Pour améliorer la productivité des lignées

productives, les sélectionneurs doivent associer de manière adaptée les caractères de productivité et la tolérance à la maladie pour les exploiter sur le terrain.

Cette étude indique une grande variation de l'incidence de la grasserie (de 9 à 99 %) chez différentes lignées après l'attaque avec une dose uniforme d'inoculum *BmNPV*. Il est clair que les différentes races diffèrent énormément dans leur tolérance relative au pathogène. Cette variation inhérente du niveau de tolérance à *BmNPV* pourrait donc être exploitée pour mettre au point des lignées résistantes / tolérantes à la grasserie avec des caractères économiques supérieurs. Cette étude a aussi montré que parmi les lignées polyvoltines, les lignées tolérantes co-existent avec des lignées sensibles et moyennement tolérantes et il existe une marge importante pour utiliser ces lignées polyvoltines tolérant *BmNPV*, pour mettre au point des lignées résistant / tolérant à la grasserie avec des caractères économiques supérieurs. Aratake (1973) a obtenu des résultats similaires. La variabilité observée parmi les différentes lignées indique qu'il pourrait y avoir différents mécanismes génétiques responsables de la tolérance à *BmNPV*. Zhiqi Meng (1982) a rapporté que la variation entre les différentes lignées de vers à soie par rapport à leur tolérance à *BmNPV* est régulée par une paire de gènes principaux dominants et quelques gènes à effet mineur et que la résistance de la descendance F1 surpasse celle des parents supérieurs et présente une forte hétérosis. Les vers à soie bivoltins seraient plus sensibles à *BmNPV* que les lignées polyvoltines (Liu Shixian, 1984 ; Sivaprakasam et Rabindra, 1995). Ratna Sen et coll., (1997) ont observé que les souches sans diapause du ver à soie *Bombyx mori* L. sont plus tolérantes par comparaison aux souches à diapause. Les résultats de cette étude indiquent aussi que les croisements obtenus sont supérieurs à leurs lignées parentales, en termes de tolérance relative à *BmNPV*, ce qui suggère qu'il y a de grandes chances pour que la tolérance à *BmNPV* soit transmise de manière génétique à la génération suivante.

Pour mettre au point des lignées résistantes / tolérantes à la polyédrose nucléaire, il est essentiel que le mécanisme génétique qui sous-tend la tolérance chez une lignée ou une souche particulière soit correctement compris, de manière à transmettre efficacement la tolérance chez une lignée productive, pour améliorer le niveau de productivité en matière de récolte de cocons au niveau des fermiers, en assurant une meilleure survie des vers à soie pendant l'élevage (Ratna Sen et coll., 1997).

REACTION OF VARIOUS MULBERRY VARIETIES TO TWIG BLIGHT DISEASE

N. A. MUNSHI, M.Y. GHANI AND N. A. MIR*

Division of Sericulture, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences & Technology of Kashmir, Post Box No. 674, GPO Srinagar – 190 001, Kashmir, India.

None of the 34 mulberry (*Morus* sp.) varieties showed complete tolerance/resistance reaction against *Fusarium pallidorozeum* causing twig blight disease but there exists significant difference in their tolerance/susceptibility. Temperate varieties have shown some tolerance but tropical varieties were highly susceptible. Under natural epiphytotics minimum disease was recorded in Enshutakasuka (3.63%), Kokuso-20 (3.87%), Obawase (4.05%) and Chatatul (5.04%) and maximum on Tr-4 (41.35%) and Kanva-2 (41.26%). Under artificial epiphytotics comparatively less disease was observed on Kokuso-20 (23.20%) and Kasuga (24.19%) and more disease on Kanva-2 (80.98%). Area of inhibition zone produced by healthy cortical discs was more by Kokuso-20 (24.46 cm²) and less by Kanva-2 (4.7 cm²), Tr-4 (6.13 cm²) and S1708 (6.40 cm²). Area of inhibition zone produced by acetone extract of diseased cortex was more by Kokuso-20 (25.21 cm²) and less by Tr-4 (5.14 cm²), Kanva-2 (5.29 cm²) and S1708 (5.58 cm²).

Keywords: *Fusarium pallidorozeum*, mulberry, susceptibility, tolerance, twig blight disease.

INTRODUCTION

Fusarial blight is one of the major economically important diseases of mulberry occurring both in tropical and temperate regions of the world. The disease results in blighting of twigs, leaves, saplings and seedlings besides causing dieback, basal rot and cutting rot, thus badly damages the plant and affects the quality and quantity of leaves. Number of *Fusarium* species have been reported to cause this disease in various parts of the world, which includes *F. lateritium* f. sp. *mori*, *F. solani* f. sp. *mori*, *F. moniliforme*, *F. roseum* and *F. pallidorozeum* (Gviepadze, 1976; Saito *et al.*, 1990; Gu *et al.*, 1990). *Fusarium pallidorozeum* (Cooke) Sacc. was found to be commonly responsible for twig blight disease of mulberry in Kashmir valley (Munshi *et al.*, 2003). Many fungicides are reported to be effective in combating the disease (Govindaish *et al.*, 1990; Mandal, 1993; Munshi, 1998), however, growers seem reluctant to use them mainly because of economical constraint and apprehension of residual toxicity to silkworm (*Bombyx mori* L.). This has focused the attention of mulberry researchers on the use of eco-friendly method to manage this disease. Since, mulberry is strictly cross-pollinated tree plant and contains high heterozygosity; therefore, the identification of resistant/tolerant variety (s) among existing gene pool will be congenial, economically viable and long lasting method to fight this disease. During present study 34 mulberry varieties (Table I) which include improved temperate exotic cultivars introduced mainly from Japan and Italy, indigenous mulberry and some recently introduced tropical varieties from other states of the country, were screened for their tolerance/susceptibility against twig blight disease caused by *F. pallidorozeum*.

* Former Professor & Head, Division of Plant Pathology, SKUAST-K

MATERIAL AND METHODS

Varieties resistance test was carried both under natural and artificial conditions of inoculation on semi-tall plantation of each test variety maintained in Mulberry Germ Plasma Bank of Division of Sericulture continuously for three years. The varieties were also screened by direct methods of *in vitro* zone of inhibition development against test fungus in seeded plates by healthy cortical discs and by filter paper discs immersed in acetone extract of diseased cortex.

The 34 varieties screened includes 22 temperate varieties (Goshoerami, Kokuso-21, Ichinose, Serpentine, Kokuso-20, Kokuso-27, Kairyoroso, Muki, Limoncina, Chinarpai, Enshutakasuka, Kasuga, Lajward, Tomieiso, Senmetsu, Obawase, Takawase, Chatatul, Robeshsernal, KNG, Japan Mirgund and France) and 12 tropical varieties (Serpentine, Kanva-2, Zust, Berhampore, Chinese White, Tr-1, Tr-4, Tr-20, S1708, Kosen, Tr-10 and Mandalaya). The temperate varieties have been evolved in temperate region of the world and are mostly frost resistant but hard to root through cuttings. They have been mainly introduced in the valley from Japan and Italy and also contains some indigenous ones. The tropical varieties have been evolved in tropical states of the country and are frost susceptible but fast rooter through cuttings.

Under artificial conditions of inoculation three random samples each consisting of five plants and representing replication were selected and tagged in the month of August each study year. Since, at the time of sprouting, the browned and sporulated lesions become more clear and blighted twigs or portion there of fail to sprout, observations were made after overwintering in following spring (Plates 1 & 2). All the twigs of each replicate were taken as assessment units (Gangwar and Tangavelu, 1991).

Disease severity was calculated by the following formula proposed by James (1983)

$$\text{Per cent disease severity} = \frac{\text{Length of blight portion of assessment unit}}{\text{Total length of assessment unit}} \times 100$$

To calculate per cent disease intensity assessment units of each replicate were grouped into 0-9 grade scale on the basis of disease severity (Munshi *et al.*, 2004). These grades include 0 = no disease, I = 1-10%, II = 11-20%, III = 21-30%, IV = 31-40%, V = 41-50%, VI = 51-60%, VII = 61-70%, VIII = 71-80% and IX = 81-100% length of assessment unit blighted. The per cent disease intensity was calculated as per FAO (1967) method of plant disease assessment. The formula applied is as under.

$$\text{Per cent disease intensity} = \frac{\sum \text{numerical values} \times \text{grades}}{\text{Total number of observations}} \times \frac{100}{\text{Maximum grade}}$$

Under artificial conditions of inoculation five plants were selected randomly from every test variety in the first week of August in each experimental year. Each selected plant represents replication. Three branches of each plant were pruned at the height of 60 cm from the crown with the help of sterilized blade. Each pruned branch was inoculated through cut end by placing 7 mm disc of monospore culture of the test fungus *F. pallidoseum*. The cut end was covered by moist cotton wrap and sealed with cellophane tape (Plates 3 and 4), also portion of branch was covered with polythene bag for 48 hours to maintain high humidity. Each branch was re-inoculated through the same cut after 10 days of 1st inoculation. Disease severity and later disease intensity was calculated in following spring, similarly, as in natural conditions of inoculation.

Under *in vitro* zone of inhibition development method, the procedure applied by Shirata and Takahashi (1982) to determine the anti-fungal activity of the tissue of mulberry and arboreal plants has been applied to screen out mulberry varieties for their tolerance/susceptibility against twig blight disease causing pathogen. Five cortical discs with 3 mm diameters and 2 mm thickness were selected out from semi soft portion of five one year old branches obtained from five randomly selected plants.



Plate 1. Germplasm Bank (Division of Sericulture, SKUAST-K).

Photo 1. Banque Génétique (Département de Sériciculture, SKUAST-K).



Plate 2. Screening under natural conditions of inoculation.

Photo 2. Evaluation dans des conditions naturelles d'évaluation.



Plate-3. Artificial inoculation.

Photo 3. Inoculation artificielle.



Plate 4. Screening under artificial conditions of inoculation.

Photo 4. Evaluation dans des conditions artificielles d'inoculation.



Plate 5. Screening by zone of inhibition produced by healthy cortical discs.

Photo 5. Evaluation d'après la zone d'inhibition produite par les disques corticaux sains.



Plate 6. Screening by zone of inhibition produced by filter paper discs immersed in acetone extract of diseased cortex.

Photo 6. Evaluation d'après la zone d'inhibition produite par les disques de papier filtre immergés dans l'extrait acetone de l'écorce malade.

The selected portion was first surface sterilized with 0.1 per cent mercuric chloride and then washed several times with sterilized distilled water. The bark of the selected portion was removed carefully and cortical disc of above mentioned size was cut with the help of ring and sterilized blade. All the five discs of each variety were placed on test fungus seeded potato dextrose agar petri plates. The plates were incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 48 hours. The diameter of inhibition zones produced by cortical discs against test fungus (Plate 5) were measured and area of inhibition zone calculated by the formula $\pi(R^2 - r^2)$, Where 'R' is the radius of inhibition zone and 'r' the radius of cortical discs

Under *in vitro* zone of inhibition development by acetone extract of diseased cortex the procedure applied by Shirata *et al.* (1978a) for the study of production of anti-fungus substances by infected shoots of arboreal plants have been adopted with some modification. One year old shoots of 34 varieties were collected in 2nd week of April. They were cut into short sticks of approximately 30 cm long and 1 cm diameter. These shoots were surface sterilized with 80 per cent ethanol for a minute. The cut surface were coated with paraffin wax. Two pieces of bark each 5×1.5 cm were taken off from each shoot at two places. Each exposed portion was inoculated with 5 ml of spore suspension of test fungus with spore load of 1×10^8 spores per ml. The cortex was covered with moist cotton wrap, sealed with cellophane tape. The shoots were kept in moist chamber and incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 8 days. After incubation the inoculated portions turned brown. From browned portions of each shoot 0.4 g tissue was sliced with sharp sterilized blade and immersed in 2 ml acetone immediately. They were kept as such at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 3 hours and then removed. After acetone evaporated, sterilized filter paper discs (5 mm diameter) were dipped in acetone extract of each variety and placed aseptically on test fungus seeded potato dextrose agar plates. For each variety four paper discs were placed on one seeded plate. Each paper disc represents one replicate. Diameter of the inhibition zone developed (Plate 6) were measured after 48 hours of incubation at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and area of inhibition zone calculated by the formula $\pi(R^2 - r^2)$, where 'R' is the radius of inhibition zone and 'r' the radius of filter paper disc.

RESULTS AND DISCUSSION

It is evident from Table I that all the varieties tested were susceptible to the disease even under natural inoculum but to a significantly varying extent. Minimum disease intensity (3.63%) was recorded in variety Enshutakasuke and maximum (41.35%) in variety Tr-4, but varieties Kokuso-20, Obawase and Chatatul with disease intensity of 3.87, 4.05 and 5.04 per cent respectively were statistically identical with Enshutakasuke. Similarly variety Kanva-2 with 41.26 per cent disease was identical with Tr-4. However, on the basis of degree of tolerance/susceptibility varieties could be grouped into five different categories or reaction groups namely tolerant (no disease), moderately tolerant (1-10.9% disease), moderately susceptible (11-20.9% disease), susceptible (21-30.9% disease), and highly susceptible (31% and above disease). As indicated by Table II none of the varieties screened under natural inoculum showed complete tolerant reaction to blight disease. Twenty temperate varieties were moderately tolerant, five varieties could be placed in moderately susceptible category out of which Berhampore and Serpentine are originally tropical and three others are temperate varieties. Only one variety namely Chinese white belonged to susceptible group whereas eight tropical varieties fall in highly susceptible category. Disease intensity was significantly different in three years. Less disease (7.58%) was recorded in 1st year and more (10.11%) in second year. Variety and year interaction was positive.

It is also evident from Table III that test varieties differed significantly in their disease intensity when screened under artificial conditions of inoculation. All the test varieties were susceptible but minimum disease (23.23%) was recorded in Kokuso-20 and maximum (80.98%) in Kanva-2. Variety Kasuga with 24.19 per cent disease was found statistically identical with Kokuso-20.

Table I. Performance of different mulberry varieties towards twig blight disease caused by *F. pallidroseum* under natural conditions of inoculation.
Tableau I. Performance de différentes variétés de mûrier par rapport à la maladie de la flétrissure des rameaux provoquée par *F. pallidroseum* dans des conditions naturelles d'inoculation.

S. No	Variety	Average disease intensity (%)			
No. de Variété	série	Intensité moyenne de la maladie (%)			
		2001	2002	2003	Mean / Moyenne
1	Goshoerami	13.69 (21.70)	13.34 (21.32)	13.90 (21.88)	13.65 (21.63) ^f
2	Kokuso-21	4.18 (11.70)	7.66 (16.0)	4.89 (12.75)	5.58 (13.50) ^h
3	Ichinose	7.41 (15.79)	8.24 (16.68)	8.40 (16.82)	8.02 (16.43) ^g
4	Serpentine	12.02 (20.25)	12.34 (20.56)	13.09 (21.05)	12.48 (20.62) ^f
5	Kokuso-20	2.78 (9.52)	5.77 (13.88)	3.05 (10.02)	3.87 (11.14) ⁱ
6	Kokuso-27	4.09 (11.65)	8.21 (16.63)	5.59 (13.63)	5.96 (13.97) ^h
7	Kanva-2	35.40 (36.50)	49.52 (44.70)	38.85 (38.55)	41.26 (39.92) ^a
8	Zust	8.38 (16.81)	14.36 (22.25)	14.78 (22.56)	12.51 (20.54) ^f
9	Berhampore	14.48 (22.21)	20.59 (26.88)	23.21 (28.51)	19.42 (25.87) ^e
10	Kairyoroso	6.75 (15.04)	7.32 (15.68)	7.50 (15.81)	7.19 (15.51) ^g
11	Muki	5.44 (13.47)	7.84 (16.25)	5.78 (13.86)	6.35 (14.53) ^{gh}
12	Limoncina	4.45 (12.14)	8.25 (16.60)	4.64 (12.35)	5.78 (13.69) ^h
13	Chinarpati	13.89 (21.67)	13.11 (2.80)	11.77 (19.72)	12.92 (20.73) ^f
14	Enshutakasuke	3.57 (10.89)	3.95 (11.44)	3.39 (10.49)	3.63 (10.94) ⁱ
15	Rokokuyoso	6.09 (14.05)	6.76 (14.98)	4.96 (12.82)	5.94 (13.95) ^h
16	Kasuga	7.05 (15.34)	10.39 (18.95)	3.47 (10.66)	6.97 (14.87) ^g
17	Lajward	7.96 (16.33)	8.15 (16.58)	4.50 (12.22)	6.87 (15.04) ^g
18	Tomieiso	5.81 (13.87)	7.40 (15.77)	5.02 (12.85)	6.08 (14.16) ^h
19	Senmetsu	16.30 (14.50)	5.75 (13.87)	3.68 (11.03)	5.24 (13.13) ^h
20	Obawase	3.02 (9.99)	4.87 (12.73)	4.28 (11.80)	4.05 (11.51) ⁱ
21	Takawase	7.46 (15.81)	7.87 (16.27)	5.34 (13.35)	6.89 (15.14) ^g
22	Chatatul	4.84 (12.69)	6.61 (14.84)	3.66 (10.90)	5.04 (12.81) ^{hi}
23	Robeshsernal	6.82 (15.11)	8.74 (17.12)	4.75 (12.75)	6.77 (14.93) ^g
24	KNG	5.38 (13.40)	7.35 (15.71)	5.24 (13.22)	5.99 (14.11) ^h
25	Japan Mirgund	8.19 16.60	9.38 (17.82)	5.98 (14.14)	7.85 (16.19) ^g
26	Francee	7.40 (12.49)	7.57 (15.96)	4.13 (11.65)	5.47 (13.37) ^h
27	Chinese White	24.57 (29.90)	35.73 (36.70)	26.69 (31.08)	29.0 (32.56) ^d
28	Tr-1	29.94 (32.95)	37.91 (38.10)	33.99 (35.69)	33.95 (35.54) ^{bc}
29	Tr-4	33.96 (35.60)	50.55 (45.31)	39.55 (38.96)	41.35 (39.95) ^a
30	Tr-20	28.30 (32.06)	38.53 (38.42)	43.57 (41.30)	36.80 (37.26) ^b
31	S1708	31.6 (34.15)	34.38 (35.89)	42.09 (40.43)	36.02 (36.82) ^b
32	Kosen	28.39 (32.14)	35.22 (36.37)	34.31 (35.84)	32.64 (34.78) ^c
33	Tr-10	21.75 (27.79)	36.85 (37.36)	46.60 (43.02)	35.07 (36.05) ^b
34	Mandalaya	21.27 (27.46)	32.62 (34.66)	42.83 (40.84)	32.24 (34.32) ^{cd}
Mean of the year					
Moyenne de l'année		7.58 (11.67) ^c	10.11 (13.63) ^a	9.23 (12.57) ^b	-

	SEM	CD @ 5%
Variety / Variété	(0.79)	(2.18)
Year / Année	(0.23)	(0.65)
Variety × Year / Variété × Année	(1.36)	(3.78)
CV =		11.22

Note: - Figures within Parenthesis are angular transformed values. Means followed by similar letters are statistically identical. / Les chiffres entre parenthèses sont les valeurs angulaires transformées. Les moyennes suivies par des lettres similaires sont identiques sur le plan statistique.

Table II. Grouping of various mulberry varieties into different tolerant susceptible categories on the basis of per cent disease intensity of twig blight under natural conditions of inoculation.

Tableau II. Regroupement de diverses variétés de mûrier dans différentes catégories, de tolérantes à sensibles, sur la base de l'intensité de la maladie de la flétrissure, dans des conditions naturelles d'inoculation.

Category	Tolerant varieties	Moderately tolerant varieties	Moderately susceptible varieties	Susceptible varieties	Highly susceptible varieties
<i>Catégorie</i>	<i>Variétés tolérantes</i>	<i>Variétés modérément tolérantes</i>	<i>Variétés modérément sensibles</i>	<i>Variétés sensibles</i>	<i>Variétés très sensibles</i>
Percent disease intensity <i>Pourcentage d'intensité de la maladie</i>	0	1-10.9	11-20.9	21-30.9	31 and above <i>31 et au-dessus</i>
	Nil / <i>Aucune</i>	Kokuso-21 Ichinose, Kokuso-20 Kokuso-27 Kairyoroso Muki, Limoncina, Enshutakasuke, Rokokuyoso, Kasuga, Lajward, Tomieiso, Senmetsu, Obawase, Takawase, Chatatul, Robeshsernal KNG, Japan Mirgund, Francee	Goshoerami Sepentine Zust, Berhampore Chinarpati	Chinese white	Kanva-2, Tr-1, Tr-4 Tr-20, S1708, Kosen, Tr-10 Mandalay-9

However, on the basis of degree of resistance/susceptibility the varieties could be grouped into four reaction categories with wider range of intensity, namely resistant (no disease), moderately resistant (1-20.9% disease), moderately susceptible (21-40.9% disease), susceptible (41-60.9% disease) and highly susceptible (61% and above disease). Table IV reveals that none of the varieties screened under artificial conditions of inoculation belonged to resistant or moderately resistant groups. Twenty two varieties showed moderately susceptible reaction. All except, Kosen are temperate varieties. Ten varieties got grouped in the susceptible category. Except Chinarpati all of them are tropical varieties. Two varieties including Chinese white and Kanva-2 were highly susceptible to blight disease.

Table III. Performance of different mulberry varieties towards twig blight disease caused by *F. pallidroseum* under artificial conditions of inoculation.

Tableau III. Performance de différentes variétés de mûrier par rapport à la maladie de la flétrissure des rameaux provoquée par *F. pallidroseum* dans des conditions artificielles d'inoculation.

Variety	Average disease intensity (%)			
Variété	Intensité moyenne de la maladie (%)			
	2001	2002	2003	Mean / Moyenne
Goshoerami	34.12 (35.69)	35.6 (36.58)	44.44 (41.79)	38.05 (38.02) ^{jk}
Kokuso-21	22.22 (28.12)	27.4 (31.51)	25.92 (30.60)	25.18 (30.07) ^p
Ichinose	32.59 (34.71)	31.84 (34.22)	35.58 (34.75)	32.34 (34.56) ^{m*}
Serpentine	39.25 (38.76)	39.99 (39.20)	41.47 (40.08)	40.24 (39.35) ⁱ
Kokuso-20	20.73 (27.06)	25.18 (30.04)	23.7 (29.11)	23.2 (28.74) ^q
Kokuso-27	27.4 (31.52)	32.58 (34.75)	28.14 (32.0)	29.37 (32.76) ⁿ
Kanva-2	77.77 (61.92)	85.92 (68.11)	79.25 (63.15)	80.98 (64.39) ^a
Zust	43.7 (41.37)	50.36 (45.21)	44.44 (40.93)	45.67 (42.50) ^{gh}
Berhampore	44.44 (41.80)	49.62 (44.89)	42.95 (40.93)	45.67 (42.50) ^{gh}
Kairyoroso	33.33 (35.26)	39.99 (39.21)	40.73 (39.64)	38.02 (38.04) ^j
Muki	30.36 (33.41)	33.32 (35.21)	31.84 (34.32)	31.84 (34.31) ^m
Limoncina	31.84 (34.32)	33.33 (35.26)	42.95 (40.93)	36.04 (36.84) ^{kl}
Chinarpati	44.44 (41.79)	53.33 (46.91)	44.44 (41.80)	47.4 (43.50) ^f
Enshutakasuke	22.22 (28.12)	27.4 (31.54)	25.92 (30.55)	25.18 (30.07) ^p
Rokokuyoso	30.36 (33.41)	32.58 (34.80)	37.03 (37.46)	33.32 (35.22) ^l
Kasuga	21.47 (27.59)	23.7 (29.11)	27.4 (31.54)	24.19 (29.41) ^{pq}
Lajward	34.07 (35.70)	43.7 (41.37)	42.22 (40.51)	39.99 (39.19) ^{ij}
Tomieiso	25.18 (30.06)	28.88 (32.48)	25.92 (30.51)	26.66 (31.01) ^{op}
Senmetsu	37.77 (37.90)	42.21 (40.50)	42.96 (40.94)	40.98 (39.78) ⁱ
Obawase	23.7 (29.09)	25.18 (30.06)	42.96 (40.93)	30.61 (33.36) ⁿ
Takawase	25.18 (30.04)	30.36 (33.41)	31.84 (34.34)	29.13 (32.60) ⁿ
Chatatul	22.22 (28.12)	25.18 (30.04)	42.22 (40.51)	29.87 (32.89) ⁿ
Robeshsernal	27.4 (31.51)	31.1 (33.87)	25.18 (30.10)	27.89 (31.82) ^o
KNG	28.14 (31.96)	33.32 (35.71)	32.58 (34.75)	31.35 (33.98) ^{mn}
Japan Mirgund	24.44 (29.60)	26.66 (31.05)	40.73 (39.65)	30.61 (33.78) ^m
Francee	25.92 (30.54)	29.62 (32.91)	37.77 (37.89)	31.1 (33.78) ^m
Chinese White	65.92 (54.30) ^d	73.32 (59.05)	68.14 (55.69)	69.13 (56.35) ^b
Tr-1	54.07 (47.36)	48.14 (43.91)	72.58 (58.51)	58.26 (49.91) ^c
Tr-4	45.18 (42.22)	51.84 (46.06)	62.95 (52.54)	53.32 (46.94) ^d
Tr-20	41.47 (40.07)	45.92 (42.65)	40.73 (35.65)	42.71 (40.79) ^{hi}
S1708	47.4 (43.51)	52.58 (46.48)	46.66 (43.07)	48.88 (44.35) ^{ef}
Kosen	30.36 (33.39)	34.06 (35.69)	35.55 (36.55)	33.32 (35.21) ^{lm}
Tr-10	40.05 (39.19)	41.49 (40.06)	41.47 (40.07)	41.00 (39.77) ⁱ
Mandalaya	48.88 (44.35)	54.81 (47.76)	51.1 (45.63)	51.59 (45.91) ^{de}
Mean of the year				
Moyenne de l'année	35.4 (36.29) ^C	39.43 (38.79) ^B	41.08 (39.77) ^A	-
			SEM	CD 5%
Variety / Variété			(0.62)	(1.73)
Year / Année			(0.16)	(0.51)
Variety × Year / Variété × année			(1.08)	(2.99)
CV			6.30	

Table IV. Grouping of various Mulberry varieties into different tolerant/ susceptible categories on the basis of per cent disease intensity of twig blight under artificial conditions of inoculation

Tableau IV. Regroupement des diverses variétés de mûrier dans différentes catégories, de tolérantes à sensibles, sur la base du pourcentage d'intensité de la maladie de la flétrissure, dans des conditions artificielles d'inoculation.

Category <i>Catégorie</i>	Resistant varieties <i>Variétés résistantes</i>	Moderately resistant varieties <i>Variétés modérément résistantes</i>	Moderately susceptible varieties <i>Variétés modérément sensibles</i>	Susceptible varieties <i>Variétés sensibles</i>	Highly susceptible varieties <i>Variétés très sensibles</i>
Per cent disease intensity <i>Pourcentage d'intensité de la maladie</i>	0	1-20.9	21-40.9	41-60.9	61-100
	Nil	Nil	Kokuso-21 Ichinose, Kokuso-20 Kokuso-27 Kairyoroso, Muki, Limoncina Enshutakasuke, Rokokuyoso, Kasuga, Lajward, Tomieiso, Obawase, Takawase Chatatul, Robeshsernal, KNG, Japan Mirgund Francee Senmetsu, Goshoerami, Kosen	Serpentine Zust Berhampore Chinarpati Tr-1, Tr-2 Tr-20 S1780, Tr-10 & Mandalaya	Kanva-2 & Chinese white

From the data presented in Table V it is evident that healthy cortical discs of each variety produced inhibition zone against test fungus in seeded plate. But the area of inhibition zone produced by cortical discs of different varieties differed significantly from each other. Maximum of 24.46 cm² area of inhibition was produced by healthy cortical discs of variety Kokuso-20 and minimum of 4.7 cm² by Kanva-2. Variety Kokuso-20 was followed by variety Kasuga with 21.73 cm² inhibition zone area. Varieties Enshutakasuka, Tomieso, Senmetsu and Obawase with 21.21, 20.19, 20.18 and 20.99 cm² area of inhibition zone respectively were statistically identical with that of Kasuga. Similarly varieties Tr-4 and S-1708 with 6.13 and 6.40 cm² area of inhibition zone respectively were identical with variety Kanva-2. However, on the basis of area of inhibition zone developed the varieties can be

grouped in five classes namely highly susceptible (0-6.99 cm² area), susceptible (7-13.99 cm² area), moderately susceptible (14-20.99 cm² area), moderately tolerant (21-27.99 cm² area) and tolerant group (28 cm² and above area). It is evident from Table VI that none of the variety was tolerant to *F. pallidoroseum*. Three varieties namely Kokuso-20, Enshutakasuka and Kasuga were moderately tolerant and rest showed moderate to highly susceptible reaction.

Table V. Screening of different mulberry varieties by zone of inhibition technique produced by healthy cortical discs on *Fusarium pallidoroseum* seeded PDA plates

Tableau V. Evaluation de différentes variétés de mûrier d'après la technique de la zone d'inhibition produite par les disques corticaux sains sur des plaques de PDAensemencées avec Fusarium pallidoroseum.

S. No.	Variety	Average area of inhibition zone (cm ²)	Sl. No.	Variety	Average area of inhibition zone (cm ²)
No. de série	Variété	Superficie moyenne de la zone d'inhibition (cm ²)	No. de série	Variété	Superficie moyenne de la zone d'inhibition (cm ²)
1	Goshocerami	11.0 ^h	18	Tomieiso	20.19 ^b
2	Kokuso-21	18.92 ^{cd}	19	Senmetsu	20.18 ^{bc}
3	Ichinose	12.79 ^g	20	Obawase	20.99 ^b
4	Serpentine	8.97 ⁱ	21	Takawase	15.58 ^{ef}
5	Kokuso-20	24.46 ^a	22	Chatatul	12.57 ^g
6	Kokuso-27	17.68 ^{de}	23	Robeshsernal	17.95 ^d
7	Kanva-2	4.70 ^k	24	KNG	15.35 ^f
8	Zust	10.80 ^h	25	Japan Mirgund	12.16 ^{gh}
9	Berhampore	10.42 ^{hi}	26	Francee	15.37 ^f
10	Kairyoroso	16.75 ^e	27	Chinese White	8.33 ^j
11	Muki	13.62 ^{fg}	28	Tr-1	8.84 ⁱ
12	Limoncina	13.03 ^g	29	Tr-4	6.13 ^k
13	Chinarpatri	7.47 ^j	30	Tr-20	6.85 ^j
14	Enshutakasuke	21.21 ^b	31	S1708	6.40 ^{jk}
15	Rokokuyoso	15.35 ^f	32	Kosen	11.38 ^h
16	Kasuga	21.73 ^b	33	Tr-10	10.80 ^h
17	Lajward	16.51 ^e	34	Mandalaya	8.69 ⁱ
SEM		=	0.62		
CD @ 5%		=	1.72		
CV		=	13.03%		

Note: - Means followed by same letter(s) are statistically identical. / Les moyennes suivies par la / (les) même(s) lettre(s) sont identiques sur le plan statistique.

Table VI. Grouping of various mulberry varieties into different tolerant/susceptible categories on the basis of area of inhibition zone produced by healthy cortical discs on *F. pallidroseum* seeded plates.

*Tableau VI. Regroupement des variétés de mûrier dans différentes catégories, de tolérantes à sensibles, sur la base de la superficie de la zone d'inhibition produite par les disques corticaux sains, sur des plaques ensemencées avec *F. pallidroseum*.*

Category	Highly susceptible varieties	Susceptible varieties	Moderately susceptible varieties	Moderately tolerant varieties	Tolerant varieties
Catégorie	Variétés très sensibles	Variétés sensibles	Variétés modérément sensibles	Variétés modérément tolérantes	Variétés tolérantes
Area of Inhibition zone (cm ²) <i>Superficie de la zone d'inhibition (cm²)</i>	0-6.99	7-13.99	14-20.99	21-27.99	28 and above 28 et au-dessus
	Kanva-2 Tr-1, Tr-4 Tr-20 S1708	Goshorerami, Ichinose, Serpentine, Zust, Berhampore, Muki, Limoncina, Chinarpati, Chatatul, Japan, Mirgund, Chinese White, Tr-1, Kosen, Tr-10, Mandalaya	Kokuso-21, Kokuso-27, Kairyoroso, Rokokuyoso, Lajward, Tomieiso, Senmetsu, Takawase, Obawase, Robeshsernal, KNG, Francee	Kokuso-20 Enshutakasuke Kasuga	Nil / Nulle

From Table VII it is clear that there exists significant differences in area of inhibition zones developed by filter paper discs, immersed in acetone extract of diseased cortex of different mulberry. Maximum of 25.21 cm² area of inhibition zone was produced by acetone extract of variety Kokuso-20 and minimum of 5.14 cm² by that of Tr-4. Variety Kasuga with 22.92 cm² area of inhibition zone followed Kokuso-20. Whereas varieties Kanva-2 and S1708 with 5.29 and 5.58 cm² area of inhibition zones respectively were statistically at par with that of Tr-4. However, here also on the basis of area of inhibition zone, five categories of varieties could be recognised as in inhibition zones produced by healthy cortical tissue. It is clear from Table VIII that none of the varieties could be categorised as tolerant. Kokuso-20 and Kasuga were moderately tolerant. Sixteen varieties belonged to moderately susceptible group and all were temperate varieties. Twelve varieties were found to belong to susceptible category. Four varieties namely Kanva-2, Tr-1, Tr-4 and S1708 exhibited highly susceptible response.

Table VII. Screening of various mulberry varieties against twig blight by zone of inhibition technique developed on *Fusarium pallidoroseum* seeded PDA plates by filter paper discs immersed in acetone extract of 10 days old inoculated detached twigs.

Tableau VII. Evaluation de différentes variétés de mûrier vis à vis de la flétrissure, d'après la technique de la zone d'inhibition mise au point sur des plaques de PDA ensemencées avec *Fusarium pallidoroseum*, au moyen de disques de papier filtre immergés dans l'extrait acétone de brindilles détachées inoculées depuis 10 jours.

S. No.	Variety	Average area of inhibition zone (cm ²)	S. No.	Variety	Average area of inhibition zone (cm ²)
No. de série	Variété	Superficie moyenne de la zone d'inhibition (cm ²)	No. de série	Variété	Superficie moyenne de la zone d'inhibition (cm ²)
1	Goshoerami	12.35 ^g	18	Tomieiso	17.41 ^d
2	Kokuso-21	18.14 ^d	19	Senmetsu	15.94 ^c
3	Ichinose	14.32 ^f	20	Obawase	15.47 ^f
4	Serpentine	10.11 ^j	21	Takawase	15.93 ^d
5	Kokuso-20	25.21 ^a	22	Chatatul	14.80 ^f
6	Kokuso-27	17.91 ^d	23	Robeshsernal	15.25 ^e
7	Kanva-2	5.29 ^m	24	KNG	15.02 ^{ef}
8	Zust	9.54 ^j	25	Japan Mirgund	12.35 ^{gh}
9	Berhampore	11.72 ^{hi}	26	Francee	16.66 ^{de}
10	Kairyoroso	15.71 ^c	27	Chinese White	7.06 ^{kl}
11	Muki	11.31 ^h	28	Tr-1	5.91 ^l
12	Limoncina	14.10 ^{fg}	29	Tr-4	5.14 ^m
13	Chinapati	7.90 ^k	30	Tr-20	7.21 ^k
14	Enshutakasuke	20.73 ^c	31	S1708	5.58 ^{lm}
15	Rokokuyoso	15.55 ^{de}	32	Kosen	11.84 ^h
16	Kasuga	22.92 ^b	33	Tr-10	7.71 ^k
17	Lajward	14.56 ^f	34	Mandalaya	4.48 ^{jk}

SEM	=	0.64
CD @ 5%	=	1.76
CV	=	8.39

Note: - Means followed by same letter(s) are statistically identical. / Les moyennes suivies par la / les même(s) lettre(s) sont identiques sur le plan statistique.

No report is available on the reaction of all the above varieties towards twig blight (*F. pallidoroseum*) disease. However, Onozawa (1958) reported possible relationship between the chemical constituents of the bark of the trees and their resistance to mulberry blight. Shirata *et al.* (1979) reported that among ten varieties of mulberry cv. Kenmochi proved resistant and Kokuso-21 susceptible to twig blight caused by *F. lateritium*. They further reported that resistance/susceptibility was dependent upon the cultivars and fungus species, as *F. lateritium* produced larger lesions on the

cv. Ichinose than cv. Kairyo-nemumigaeshi but opposite results were found with *F. solani* f. sp. *mori*. Govindiah *et al.*, (1990) found Kanva-2 comparatively susceptible to leaf blight (*F. pallidroseum*) and Kalliaknlachi, Calabresa, Selection 532, ACC-144, 115, 117, 119, 121 and 128 moderately resistant under natural inoculum. Sharma *et al.*, (1993) found Kanva-2 more susceptible to leaf blight (*F. pallidroseum*) than S54 in Chakigardens of Mysore. Mandal (1993) observed twig blight (*F. solani*) more severe in varieties like Goshierami, Kasuga, Rokokuyoso, Ichinose, Limoncina and Serpentine. Sharma *et al.*, (1996) reported different response of S54, S36, S34 and MR4 varieties to leaf blight (*F. pallidroseum*) in different season. Variable reaction of some cultivars tested against twig blight in different states may be either due to variation in pathogen or existence of the races in pathogen.

Table VIII. Grouping of various mulberry varieties into different tolerant/susceptible categories on the basis of area of inhibition zone produced by healthy cortical discs on *F. pallidroseum* seeded plates.

Tableau VIII. Regroupement des variétés de mûrier dans différentes catégories de tolérantes à sensibles sur la base de la superficie de la zone d'inhibition produite par des disques corticaux sains, sur des plaques ensemencées avec *F. pallidroseum*.

Category	Highly susceptible varieties	Susceptible varieties	Moderately susceptible varieties	Moderately tolerant varieties	Tolerant varieties
Catégorie	Variétés très sensibles	Variétés sensibles	Variétés modérément sensibles	Variétés modérément tolérantes	Variétés tolérantes
Area of inhibition zone (cm ²)	0-6.99	7-13.99	14-20.99	21-27.99	28 and above
Superficie de la zone d'inhibition (cm ²)					28 et au dessus
	Kanva-2 Tr-1, Tr-4 Tr-20, S1708	Goshierami, Serpentine, Zust Berhampore Muki Chinarpati, Japan Mirgund, Chinese white, Tr20, Kosen Tr-10 Mandalaya	Kokuso-21 Ichinose Kokuso-27, Kairyoroso Limoneina, Enshutakasuke, Rokokuyoso, Lajward, Tomieiso, Senmetsu, Takawase, Obawase, Chatalul, Robeshsernal, KNG, Francee	Kokuso-20 Kasuga	Nil / Aucune

The development of inhibition zone by healthy cortical discs and acetone extract of disease cortex on test fungus seeded potato dextrose agar plates can be due to the production of phytoalexins, which play an important role in disease resistance. Shirata *et al.* (1978a) reported antifungal activity from acetone extract of diseased cortex of mulberry inoculated with *F. solani* f. sp. *mori* employing four different methods using spores of *Bipolaris leersia*. Shirata *et al.*, (1978b) tested 35 species of fungi belonging to 27 genera for their tolerance to antifungal substances and reported that seven species of mulberry pathogens were more tolerant to Moracin A and Moracin B than non-pathogens, but some relationship was observed between pathogenicity of *F. solani* f. sp. *mori*, *F. lateritium* f. sp. *mori* and *F. roseum* pathogens of mulberry twig blight and their tolerance to Moracin A and Moracin B. Shirata and Takahashi (1979) reported presence of these antifungal substances in both inoculated and uninoculated fragments of xylem. Shirata *et al.*, (1982) detected antifungal activity in one year old shoots of 22 species belonging to 11 families including Moraceae by placing cortical discs on PDA medium seeded with 5 species of fungi and 2 species of bacteria.

Thus present study has shown that none of the 34 varieties screened by four different methods showed complete tolerant/resistant reaction to the twig blight disease caused by *F. pallidoroseum*. However, there are significant differences in their degree of tolerance/susceptibility. Temperate varieties have shown moderately tolerant reaction whereas tropical varieties fall in highly susceptible category. Among temperate varieties Kokuso-20 and Kasuga have shown more tolerance whereas Kanva-2 and Tr-4 have shown maximum susceptibility.

REFERENCES

- FAO, 1967. Papers presented at Symposium of Crop Losses. Rome, FAO, UN.
- GANGWAR S.K. & THANGAVELU K. 1991. Occurrence of mulberry diseases in Tamil Nadu. Indian Phytopath. 44 : 545-547.
- GOVINDAIAH; SHARMA D.D., SINGHA B.K. & SANGUPTA K. 1990. *Fusarium pallidoroseum* (Cooke) Sacc. A new pathogen causing leaf blight in mulberry. Indian J. Seric. 29 : 291-292.
- GU Z.F., WANG, G.C. & BOA J. R. 1990. Studies on the *Fusarium* species occurring on mulberry plants in ZheJang Province. Acta Agriculturae Universitatis ZheJiangensis 16(Suppl-2) : 269-274.
- GVINEPADZE M. Sh. 1976. Effect of temperature and humidity on growth and development of *Fusarium lateritium* Nees. Zashchity Rastemii. Gruz : SSR 28 : 99-101.
- JAMES W.C. 1983. Crop loss assessment. In : Plant Pathology Pocketbook (Eds. A. Johnston and C. Booth). Common Wealth Mycological Institute, Kew. Surrey England, pp 130-143.
- MANDAL S. K. 1993. Twig blight and a new leaf spot disease of mulberry. Indian Silk 32(3) : 51-52.
- MUNSHI N. A. 1998. Studies on the Fusarial blight of mulberry (*Morus* sp.). Ph.D thesis submitted to S.K. University of Agricultural Sciences & Technology (J&K), Shalimar, Srinagar, p. 198.
- MUNSHI N.A., LONE A.H., MIR S.A. & RAJA T.A. 2003. Effect of pruning season, pruning method and spacing on twig blight (*Fusarium pallidoroseum*) of mulberry (*Morus* sp.). Appl. Biol. Res. 5 : 28-31.
- MUNSHI N. A., TANKI T.N., ZARGAR M.A., SUHAF K.A. & DAR H. U. 2004. Effect of variety and plantation system on intensity of twig blight disease (*Fusarium pallidoroseum*) of mulberry (*Morus* sp.). SKUAST J. Res. 6 : 95-100.
- ONozAWA Y. 1958. Studies on the mulberry blight (1) on the physiological characters in relation to varietal differences of resistance to mulberry blight. Japan J. Breed. 7(3) : 186-190.
- SAITO H., YAMADA N., NAICHNISHI H. & MATUO T. 1990. Chlamydospore formation of *Fusarium lateritium* f. sp. *mori* and *F. solani* f. sp. *mori* in soil extract and detection of both fungi and other fusaria from soil of *Fusarium* blight causing mulberry fields. J. Seric. Sci. Japan 47(3): 193-200.
- SHARMA D.D., GOVINDAIAH, GHOSH A., PHILIP A., AMBIAKA P.K. & CHOUDHURY P.C. 1996. Effect of season, spacing, host genotype and fertilizer doses on the incidence of major foliar diseases in mulberry. Indian J. Seric. 35(1) : 57-61.

- SHARMA D. D., GOVINDAIAH., MISHRA R.K., CHOUDHURY P.C., BAJPAL A.K. & DATTA R. R. 1993. Influence of various agronomical practices and inputs on the incidence of mulberry diseases in Chawki gardens. *Indian J. Seric.* 32(2) : 150-155.
- SHIRATA A. 1978. Production of phytoalexins in cortex tissue of mulberry shoot. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 44(4) : 485-492.
- SHIRATA A. 1982. Antifungal activity of bark pieces of mulberry shoot and factors causing its change. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 48(2) : 147-152.
- SHIRATA A. & TAKAHASHI K. 1979. Production of phytoalexins in xylem tissues of mulberry shoots. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 45(2) : 162-167.
- SHIRATA A. TAKAHASHI K. 1982. Antifungal activity of tissue of mulberry and arboreal plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 48(2) : 141-146.
- SHIRATA A., TAKAHASHI K. & TOMIYAMA K. 1978a. Antifungal substances in infected shoots of arboreal plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 44(3) : 340-343.
- SHIRATA A., TAKAHASHI K., TAKASUGI M., NAGOO S. & MASAMUNE T. 1978b. Antifungal and antibacterial activities of phytoalexins moracin A and B isolated from mulberry. *Bull. Seric. Expt. Stn.* 27(5) : 647-659.

REACTION DE DIFFERENTES VARIETES DE MURIER A LA MALADIE DE LA FLETRISSURE DES RAMEAUX

N. A. MUNSHI, M. Y. GHANI & N. A. MIR*

Division of Sericulture, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences & Technology of Kashmir, Post Box No. 674, GPO Srinagar - 190 001, Cachemire, Inde.

*Aucune des 34 variétés de mûrier (Morus sp.) ne présente une réaction de tolérance / de résistante complète à **Fusarium pallidorozeum**, qui entraîne la maladie de la flétrissure des rameaux mais il existe une différence significative entre leur tolérance /sensibilité. Les variétés tempérées présentent une certaine tolérance mais les variétés tropicales sont très sensibles. Sous une épiphytie naturelle, on enregistre un minimum de maladie chez Enshutakasuka (3,63 %), Kokuso-20 (3,87 %), Obawase (4,05 %) et Chatatul (5,04 %) et un maximum chez Tr-4 (41,35 %) et Kanva-2 (41,26 %). Sous une épiphytie artificielle, on observe comparativement moins de maladie chez Kokuso-20 (23,20 %) et Kasuga (24,19 %) et plus de maladie chez Kanva-2 (80,98 %). La surface de la zone d'inhibition produite par les disques corticaux sains est plus importante chez Kokuso-20 (24,46 cm²) et moins importante chez Kanva-2 (4,7 cm²), Tr-4 (6,13 cm²) et S1708 (6,40 cm²). La surface de la zone d'inhibition produite par l'extrait acétone de l'écorce malade est plus importante chez Kokuso-20 (25,21 cm²) et moins importante chez Tr-4 (5,14 cm²), chez Kanva-2 (5,29 cm²) et S1708 (5,58 cm²).*

INTRODUCTION

La flétrissure ou la cloque est l'une des principales maladies du mûrier importantes sur le plan économique, qui se rencontre à la fois dans les régions tropicales et tempérées du monde. La maladie entraîne la flétrissure des brindilles, des feuilles, des jeunes plants et des plantules tout en provoquant le dépérissement, le pourrissement basal et la pourriture des boutures, ce qui endommage gravement les plants et a un effet sur la qualité et la quantité des feuilles. On a rapporté qu'un certain nombre d'espèces de *Fusarium*, qui incluent *F. lateritium* f. sp. *mori*, *F. solani* f. sp. *mori*, *F. moniliforme*, *F. roseum* et *F. pallidorozeum*, entraînent cette maladie dans diverses parties du monde (Gviepadze, 1976 ; Saito et coll., 1990 ; Gu et coll., 1990). *Fusarium pallidorozeum* (Cooke) Sacc. s'avère être couramment responsable de la maladie de la flétrissure des rameaux de mûrier dans la vallée du Cachemire (Munshi et coll., 2003). On a rapporté que de nombreux fongicides sont efficaces pour combattre la maladie (Govindaish et coll., 1990 ; Mandal, 1993 ; Munshi, 1998), cependant les cultivateurs semblent réticents à les utiliser principalement en raison de la contrainte économique et de l'appréhension de la toxicité résiduelle pour le ver à soie (*Bombyx mori* L.). Cela a poussé les chercheurs sur le mûrier à se pencher sur l'utilisation d'une méthode non nuisible pour l'environnement pour gérer cette maladie. Puisque le mûrier est un arbre pollinisé strictement de manière croisée et qu'il est très hétérozygote ; l'identification d'une / de variété(s) tolérante(s) dans le pool génétique existant représenterait donc une méthode agréable, viable sur le plan économique et durable pour combattre cette maladie. Pendant cette étude, nous avons évalué 34 variétés de mûrier (Tableau I), qui incluent des cultivars exotiques tempérés améliorés introduits principalement du

* Ancien Professeur et Directeur, Département de la Pathologie des Plantes, SKUAST-K.

Japon et d'Italie, un mûrier indigène, et des variétés tropicales récemment introduites d'autres états du pays par rapport à leur tolérance / leur sensibilité à la maladie de la flétrissure des rameaux provoquée par *F. pallidoseum*.

MATERIELS ET METHODES

On procède à un test de résistance des variétés dans des conditions naturelles et artificielles d'inoculation, continuellement pendant trois ans, dans une plantation moyennement grande de chaque variété testée, maintenue à la Banque Génétique du Mûrier de la Division de Sériciculture. On évalue aussi les variétés par des méthodes directes du développement de la zone d'inhibition *in vitro* contre le champignon testé par des disques corticaux sains et par des disques en papier filtre immergés dans l'extrait acétone de l'écorce malade.

Les 34 variétés évaluées comprennent 22 variétés tempérées (Goshoerami, Kokuso-21, Ichinose, Serpentine, Kokuso-20, Kokuso-27, Kairyoroso, Muki, Limoncina, Chinapati, Enshutakasuka, Kasuga, Lajward, Tomieiso, Senmetsu, Obawase, Takawase, Chatatul, Robeshsernal, KNG, Japan Mirgund et France) et 12 variétés tropicales (Serpentine, Kanva-2, Zust, Berhampore, Chinese White, Tr-1, Tr-4, Tr-20, S1708, Kosen, Tr-10 et Mandalaya). On a mis au point des variétés tempérées dans la partie tempérée du monde et elles sont principalement résistantes au gel mais elles racinent difficilement par des boutures. Elles ont été principalement introduites du Japon et d'Italie et proviennent aussi de certaines variétés indigènes. On a mis au point des variétés tropicales dans les régions tropicales du pays qui sont sensibles au gel mais qui racinent rapidement par boutures.

Sous des conditions artificielles d'inoculation, on sélectionne et on étiquette trois échantillons prélevés au hasard, constitués chacun de cinq plants et représentant une répétition pendant le mois d'août chaque année d'étude. Puisqu'au moment du bourgeonnement, les lésions ayant bruni et sporulé deviennent plus claires et les brindilles ou les parties atteintes par la flétrissure des rameaux ne parviennent pas à germer, on procède aux observations après l'hivernage au printemps suivant (Photos 1 et 2). On prend toutes les brindilles de chaque répétition comme des unités d'évaluation (Gangwar et Tangavelu, 1991).

On calcule la sévérité de la maladie d'après la formule suivante proposée par James (1983).

$$\text{Pourcentage de sévérité de la maladie} = \frac{\text{Longueur de l'unité d'évaluation atteinte par la flétrissure}}{\text{Longueur totale de l'unité d'évaluation}} \times 100$$

Pour calculer l'intensité du pourcentage de maladie, on regroupe les unités d'évaluation de chaque répétition en fonction d'une échelle de 0 à 9 degrés sur la base de la sévérité de la maladie (Munshi et coll., 2004). Ces degrés comprennent 0 = pas de maladie, I = 1 à 10 %, II = 11 à 20 %, III = 21 à 30 %, IV = 31 à 40 %, V = 41 à 50 %, VI = 51 à 60 %, VII = 61 à 70 %, VIII = 71 à 80 % et IX = 81 à 100 % de la longueur de l'unité d'évaluation atteinte par la flétrissure. On calcule l'intensité du pourcentage de la maladie d'après la méthode d'évaluation de la maladie d'une plante de la FAO (1967). La formule appliquée est la suivante

Intensité de pourcentage de maladie =

$$\frac{\text{Somme des valeurs numériques} \times \text{degrés}}{\text{Nombre total d'observations}} \times \frac{100}{\text{Degré maximum}}$$

Sous des conditions artificielles d'inoculation, on sélectionne cinq plants au hasard pour chaque variété testée pendant la première semaine d'août chaque année d'expérience. Chaque plant sélectionné représente une répétition. On taille trois branches de chaque plant à une hauteur de 60 cm

à partir de la cime à l'aide d'une lame stérilisée. On inocule chaque branche taillée par l'extrémité taillée, en plaçant un disque de 7 mm de culture monosporique du champignon testé *F. pallidoroseum*. On enveloppe l'extrémité taillée dans du coton humide que l'on scotche (Photos 3 et 4), on recouvre aussi une partie de la branche avec un sac de polyéthylène pendant 48 h pour maintenir une humidité élevée. On ré-inocule chaque branche par la même entaille 10 jours après la première inoculation. On calcule la sévérité de la maladie et plus tard l'intensité de la maladie, au printemps suivant, de la même manière que dans les conditions naturelles d'inoculation.

Avec la méthode de développement de la zone d'inhibition *in vitro*, on applique la procédure de Shirata et de Takahashi (1982) pour déterminer l'activité anti-fongique des tissus de mûrier et des plantes afin d'évaluer la tolérance / la sensibilité des variétés de mûrier au pathogène provoquant la maladie de la flétrissure des rameaux. On sélectionne cinq disques corticaux de 3 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur sur une partie plutôt tendre de cinq branches d'un an provenant de cinq plants sélectionnés de manière aléatoire.

On stérilise la partie sélectionnée avec du chlorure de mercure à 0,1 %, puis on la lave plusieurs fois avec de l'eau distillée stérilisée. On retire soigneusement l'écorce de la partie sélectionnée et on coupe le disque cortical de la taille mentionnée plus haut à l'aide d'une bague et d'une lame stérilisées. On place les cinq disques de chaque variété dans des boîtes de Petri d'agar de dextrose de pomme de terre ensemencées avec le champignon testé. On incube les plaques à $25 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 48 heures. On mesure le diamètre des zones d'inhibition produites par les disques corticaux contre le champignon testé (Photo 5) et on calcule la surface de la zone d'inhibition d'après la formule $\pi(R^2 - r^2)$, où «R» est le rayon de la zone d'inhibition et «r» le rayon des disques corticaux.

Avec le développement de la zone d'inhibition *in vitro* par l'extrait acétone de l'écorce malade, on adopte la procédure de Shirata et coll., (1978a), avec quelques modifications, pour l'étude de la production de substances anti-fongiques par les pousses infestées des arbres. On recueille les pousses de 34 variétés pendant la 2^{ème} semaine d'avril. On les coupe en petits bâtons d'environ 30 cm de long et de 1 cm de diamètre. On stérilise la surface de ces pousses avec 80 % d'éthanol pendant une minute. On recouvre la surface coupée avec de la cire de paraffine. On prend deux morceaux d'écorce de $5 \times 1,5$ cm à deux endroits de chaque pousse. On inocule chaque partie exposée avec 5 ml de suspension de spore du champignon testé avec une charge en spores de 1×10^8 spores par ml. On recouvre l'écorce avec du coton humide que l'on scotche. On conserve les pousses dans une pièce humide et on les incube à $25 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 8 jours. Après l'incubation, les parties inoculées brunissent. On coupe 0,4 g de tissu sur les parties brunies de chaque pousse avec une fine lame stérilisée et on l'immerge immédiatement dans 2 ml d'acétone. On les conserve telles quelles à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 3 heures, puis on les retire. Après l'évaporation de l'acétone, on plonge les disques de papier filtre stérilisés (5 mm de diamètre) dans l'extrait acétone de chaque variété et on les place de manière aseptique dans des boîtes de Petri d'agar de dextrose de pomme de terre ensemencées avec le champignon testé. On place quatre disques de papier pour chaque variété dans une boîte ensemencée. Chaque disque de papier représente une répétition. On mesure le diamètre de la zone d'inhibition qui s'est développée (Photo 6) au bout de 48 h d'incubation à $25 \pm 2^\circ \text{C}$ et on calcule la surface de la zone d'inhibition d'après la formule $\pi(R^2 - r^2)$, où «R» est le rayon de la zone d'inhibition et «r» le rayon du disque du filtre de papier.

RESULTATS ET DISCUSSION

Il est évident d'après le Tableau I que toutes les variétés testées sont sensibles à la maladie même sous un inoculum naturel mais à un degré significativement variable. On enregistre l'intensité minimum de maladie (3,63 %) chez la variété Enshutakasuke et l'intensité maximum (41,35 %) chez la variété Tr-4, mais les variétés Kokuso-20, Obawase et Chatatul, avec une intensité de la maladie de respectivement 3,87, 4,05 et 5,04 %, sont statistiquement identiques à Enshutakasuke. De même, la variété Kanva-2 avec un pourcentage de maladie de 41,26 % est identique à Tr-4. Cependant, sur

la base du degré de tolérance / de sensibilité, on peut regrouper les variétés dans cinq différentes catégories ou groupes de réaction à savoir tolérante (pas de maladie), modérément tolérante (1 à 10,9 % de maladie), modérément sensible (11 à 20,9 % de maladie), sensible (21 à 30,9 % de maladie) et très sensible (31 % de maladie et au dessus). Comme l'indique le Tableau II, aucune des variétés évaluées sous un inoculum naturel ne présente de réaction de tolérance complète à la maladie de la flétrissure. Vingt variétés tempérées sont modérément tolérantes, cinq variétés peuvent être placées dans la catégorie modérément sensible dont Berhampore et Serpentine qui sont tropicales à l'origine et trois autres qui sont des variétés tempérées. Seule une variété, à savoir Chinese white, appartient au groupe sensible tandis que huit variétés tropicales rentrent dans la catégorie très sensible. L'intensité de la maladie est significativement différente au cours des trois années. On enregistre moins de maladie (7,58 %) pendant la 1^{ère} année et plus (10,11 %) pendant la deuxième année. L'interaction variété et année est positive.

Il est aussi évident d'après le Tableau III que les variétés testées diffèrent significativement dans l'intensité de la maladie, lorsqu'on les évalue dans des conditions artificielles d'inoculation. Toutes les variétés testées sont sensibles mais on enregistre le minimum de maladie (23,23 %) chez Kokuso-20 et le maximum (80,98 %) chez Kanva-2. Le pourcentage de maladie de la variété Kasuga avec 24,19 % s'avère identique sur le plan statistique à celui de Kokuso-20.

Cependant, sur la base du degré de résistance / de sensibilité, on peut regrouper les variétés dans quatre différentes catégories de réaction, avec une fourchette d'intensité plus grande, à savoir résistante (pas de maladie), modérément résistante (1 à 20,9 % de maladie), modérément sensible (21 à 40,9 % de maladie), sensible (41 à 60,9 % de maladie) et très sensible (61 % de maladie et au-dessus). Le Tableau IV révèle qu'aucune des variétés évaluées dans des conditions artificielles d'inoculation n'appartient aux groupes de résistant à modérément résistant. Vingt deux variétés présentent une réaction modérément sensible. Toutes, sauf Kosen sont des variétés tempérées. Dix variétés se regroupent dans la catégorie sensible. Toutes sont des variétés tropicales à l'exception de Chinarpati. Deux variétés, Chinese white et Kanva-2, sont très sensibles à la maladie de la flétrissure.

D'après les données présentées dans le Tableau V, il est évident que les disques corticaux sains de chaque variété produisent une zone d'inhibition contre le champignon testé sur la plaqueensemencée. Mais la surface de la zone d'inhibition produite par les disques corticaux sains des différentes variétés diffère significativement les unes des autres. La surface maximum de 24,46 cm² d'inhibition est produite par les disques corticaux sains de la variété Kokuso-20 et la surface minimum de 4,7 cm² par Kanva-2. La variété Kokuso-20 est suivie par la variété Kasuga avec 21,73 cm² de surface de zone d'inhibition. Les variétés Enshutakasukao Tomieso, Senmetsu et Obawase avec une surface de la zone d'inhibition de respectivement 21,21 ; 20,19 ; 20,18 et 20,99 cm² sont statistiquement identiques à Kasuga. De même, les variétés Tr-4 et S-1708, avec respectivement 6,13 et 6,40 cm² de surface de zone d'inhibition, sont identiques à la variété Kanva-2. Sur la base de la surface de la zone d'inhibition développée, on peut regrouper les variétés dans cinq classes, à savoir très sensibles (surface de 0 à 6,99 cm²), sensibles (surface de 7 à 13,99 cm²), modérément sensibles (surface de 14 à 20,99 cm²), modérément tolérantes (surface de 21 à 27,99 cm²) et tolérantes (surface de 28 cm² et au-dessus). Il est évident d'après le Tableau VI qu'aucune des variétés n'est tolérante à *F. pallidroseum*. Trois variétés, à savoir Kokuso-20, Enshutakasuka et Kasuga, sont modérément tolérantes et le reste présente une réaction modérée à très sensible.

D'après le Tableau VII, il est clair qu'il existe des différences significatives des surfaces des zones d'inhibition que développent les disques de papier filtre, immergés dans l'extrait acétone de l'écorce malade des différents mûriers. La surface maximum de zone d'inhibition de 25,21 cm² est produite par l'extrait acétone de la variété Kokuso-20 et la surface minimum de 5,14 cm² par celui de Tr-4. La variété Kasuga avec 22,92 cm² de surface de la zone d'inhibition suit Kokuso-20. Tandis que les variétés Kanva-2 et S1708, avec respectivement 5,29 et 5,58 cm² de surface des zones d'inhibition, sont statistiquement à égalité avec Tr-4. Sur la base de la surface de la zone d'inhibition, on peut reconnaître cinq catégories de variétés comme pour les zones d'inhibition produites par le

tissu cortical sain. Il est clair d'après le Tableau VIII qu'aucune des variétés ne peut être considérée comme tolérante.

Kokuso 20 et Kasuga sont modérément tolérantes. Seize variétés appartiennent au groupe modérément sensible et toutes sont des variétés tempérées. Douze variétés s'avèrent appartenir à la catégorie sensible. Quatre variétés à savoir Kanva-2, Tr-1, Tr-4 et S1708 présentent une réponse très sensible.

Il n'existe aucun rapport sur la réaction de toutes les variétés citées plus haut envers la maladie de la flétrissure (*F. pallidroseum*). Cependant, Onozawa (1958) a rapporté une relation possible entre les constituants chimiques de l'écorce des arbres et leur résistance à la flétrissure du mûrier. Shirata et coll., (1979) ont rapporté que parmi les dix variétés le cv. Kenmochi s'avère résistant et Kokuso-21 sensible à la flétrissure bactérienne provoquée par *F. lateritium*. Ils ont en outre rapporté que la résistance / la sensibilité dépend des cultivars et de l'espèce de champignon, puisque *F. lateritium* produit des lésions plus grandes sur le cv. Ichinose que sur le cv. Kairyo-nemumigaeshi mais ils ont trouvé des résultats opposés avec *F. solani* f. sp. *mori*. Govindaiah et coll., (1990) ont trouvé Kanva-2 comparativement sensible à la flétrissure de la feuille (*F. pallidroseum*) et Kalliaknlachi, Calabresa, Selection 532, ACC-144, 115, 117, 119, 121 et 128 modérément résistantes sous un inoculum naturel. Sharma et coll., (1993) ont trouvé Kanva-2 plus sensible à la flétrissure de la feuille (*F. pallidroseum*) que S54 dans les Jardins Chaki de Mysore. Mandal (1993) a observé une flétrissure de la brindille (*F. solani*) plus sévère chez les variétés comme Goshorami, Kasuga, Rokokuyoso, Ichinose, Limoncina et Serpentine. Sharma et coll., (1996) ont rapporté une réponse différente des variétés S54, S36, S34 et MR-4 à la flétrissure de la feuille (*F. pallidroseum*) pendant des saisons différentes. La réaction variable de certains cultivars testés contre la flétrissure de la brindille dans différents états pourrait être due soit à la variation du pathogène ou à l'existence de races du pathogène.

Le développement de la zone d'inhibition par les disques corticaux sains et par l'extrait acétone de l'écorce malade dans les boîtes d'agar de dextrose de pomme de terreensemencées avec le champignon testé peut être dû à la production de phytoalexines, qui jouent un rôle important dans la résistance à la maladie. Shirata et coll., (1978a) ont rapporté une activité antifongique de l'extrait acétone de l'écorce malade de mûrier inoculé avec *F. solani* f. sp. *mori* avec quatre méthodes différentes en utilisant des spores de *Bipolaris leersia*. Shirata et coll., (1978b) ont testé 35 espèces de champignons appartenant à 27 genres par rapport à leur tolérance aux substances antifongiques et rapporté que sept espèces de pathogènes du mûrier sont plus tolérantes à la Moracine-A et à la Moracine-B que les non-pathogènes, mais on a observé une certaine relation entre la pathogénicité des pathogènes *F. solani* f. sp. *mori*, *F. lateritium* f. sp. *mori* et *F. roseum* de la flétrissure de la brindille du mûrier et leur tolérance à la Moracine A et à la Moracine B. Shirata et Takahashi (1979) ont rapporté la présence de ces substances antifongiques dans des fragment inoculés et non inoculés du xylème. Shirata et coll., (1982) ont détecté une activité antifongique dans des pousses d'un an de 22 espèces appartenant à 11 familles dont Moraceae en plaçant des disques corticaux sur un milieu PDA ensemencé avec 5 espèces de champignons et deux espèces de bactéries.

Cette étude montre donc qu'aucune des 34 variétés, évaluées par quatre méthodes différentes, ne présente une réaction complète de tolérance / résistance à la maladie de la flétrissure provoquée par *F. pallidroseum*. Cependant, il existe des différences significatives de leur degré de tolérance / sensibilité. Les variétés tempérées présentent une réaction de tolérance modérée tandis que les variétés tropicales rentrent dans la catégorie « très sensible ». Parmi les variétés tempérées, Kokuso-20 et Kasuga présentent plus de tolérance tandis que Kanva-2 et Tr-4 présentent une sensibilité maximum.

STUDIES ON EFFECT OF METHODS AND LEVELS OF IRRIGATION AT DIFFERENT PLANT SPACING ON ACTUAL EVAPO-TRANSPIRATION OF MULBERRY

N. SIDDALINGASWAMY¹, U. D. BONGALE¹, M. B. RAJEGOWDA²,
S. N. NARAYANGOWDA¹ & R. M. SHIVAPRAKASH¹

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

2. Department of Agrometeorology, University of Agricultural Sciences, Bangalore-560 065.
Karnataka, India.

A field experiment was conducted with different methods of irrigation (furrow, drip and chapin tape) at three levels namely 0.3, 0.6 and 0.9 cumulative pan evaporation (CPE)/ Pan evaporation (Epan) in two plant spacings (60 × 60 cm and 120 × 60 cm) of M-5 mulberry during 1998-2000 with a total of ten harvest collected during the period. This covered four experimental harvests during non-rainy period. Soil moisture reading was collected for three experimental harvests to find out actual evapo-transpiration (AET) by water balance method. Among the main treatment the highest AET was recorded in 60 × 60 cm plant spacing (3.58 mm/day), among the sub treatments the highest AET was recorded in drip irrigation (4.06 mm/day) and among the sub-sub treatments the highest AET was recorded in 0.9CPE/Epan (4.65 mm/day). Among the interactions, the highest AET was in the treatment combination of 60 × 60 cm + drip method + 0.9Epan (5.39 mm/day). The study revealed that the micro irrigation systems (drip and chapin tape) recorded the highest AET values associated with yield improvement compared to the furrow method.

Keywords: Actual evapo-transpiration, cumulative pan evaporation (CPE)/ pan evaporation (Epan), irrigation methods, mulberry, plant spacing, soil moisture.

INTRODUCTION

Mulberry is the sole food plant of silkworm (*Bombyx mori* L.) and is cultivated mainly for its foliage (as feed for the silkworm). Maximization of leaf yield and improvement in the leaf quality are considered to be the most important steps in order to enhance the cocoon production. Mulberry is a deep-rooted perennial and high-biomass producing foliage plant. It is cultivated in tropical countries throughout the year and it covers a wide range of climatic conditions ranging from tropics to the temperate. Moderate atmospheric temperature range of 24 to 28 °C is known to be optimum for the vegetative growth of the mulberry which can be grown in places with a rainfall range from about 600 mm to 2500 mm, while an humidity range from 65 to 80% and a sunshine range from 9 to 13 hours a day (Rangaswamy *et al.*, 1976).

Lack of adequate water supply is the major limiting factor in crop production in arid and semi arid regions. Therefore, water management of the crop has to be decided on the basis of water requirement necessary for actual evapo-transpiration (Savani *et al.*, 1994). One potential way to improve irrigation management is through a reliable method of determining evapo-transpiration, since this physical process primarily depletes soil water reserves. The information on evapo-transpiration, its ratio with evaporation from an open pan and efficiency of crops in using evapo-transpiration are

very useful in planning the cultural operations of the crops and scheduling irrigation (Umamaheswara Rao *et al.*, 1994). In general, evapo-transpiration increases with crop age, reaches a maximum during flowering due to maximum crop canopy, maintains itself at this level for some time and decreases gradually after then due to senescence of the crop and shedding of leaves (Lenka, 1991). The studies on evapo-transpiration also help with reasonable accuracy in designing irrigation projects for seasonal and annual needs, designing farm irrigation system with peak water use rate and predicting irrigation time and amount of water each time. Irrigation means that one must know how much, how and when to apply the water. For this purpose the evapo-transpiration estimates give requirements at different crop stages and in different seasons or climatic conditions. In cropping systems to study patterns of evapo-transpiration is also useful. By following water balance or budgeting approach, one can work out actual evapo-transpiration and water deficiency (Kokde, 1985). Rajegowda and others (2003) found the water balance technique to optimize the plant population of mango in dry land horticulture.

Under tropical conditions, especially under hot arid and semi arid areas, the rate of transpiration normally exceeds absorption. This results in moisture stress, adversely affecting the plant physiological system. In spite of this limitation, the development of optimal microclimate conditions in mulberry cultivation, so vital, especially under the tropical climate, has not so far been given adequate attention (Bongale, 2001). A few studies available on the mulberry have revealed that it is possible to save up to 45-60 percent of water adopting drip irrigation in place of furrow irrigation in mulberry (Muralidhara, 1994; Saratchandra *et al.*, 1992; Shankar *et al.*, 1996 and Siddalingaswamy *et al.*, 2004). However, studies dealing with actual evapotranspiration in mulberry for various irrigation methods/technologies are not available. Present study was hence undertaken.

MATERIALS AND METHODS

A field study was conducted at Karnataka State Sericulture Research and Development Institute for 3 years (1997-2000) in four years old established M-5 mulberry field planted during 1994. The first year of the study period was considered as the establishment year. Out of a total of ten harvests during the two subsequent years (1998-2000), four experimental harvests (two each for the two years) during the non-rainy period were observed. The soil was red sandy clay loam at a pH of 7.55 and Electrical Conductivity of 0.47 dS/m. The field capacity at 0 to 90 cm was 24.2 % and permanent wilting point was 14.5 % (pressure plate membrane apparatus method) and bulk density was 1.47 g/cc (core sampler method). The experimental design was split-split plot with 18 treatment combinations and three replications each. The treatment details are as follows.

Main treatments: Plant spacings (2):

S1 (60 × 60 cm);

S2 (120 × 60 cm);

Sub-treatments: Methods of irrigation (3):

I₁ (Furrow method);

I₂ (Drip method);

I₃ (Chapin tape method);

Sub-sub treatments: Levels of irrigation (3):

L₁ (0.3 cumulative pan evaporation (CPE)/ pan evaporation (Epan);

L₂ (0.6 CPE/Epan);

L₃ (0.9CPE/Epan).

(CPE – for Furrow method, and Epan - for Drip and Chapin tape method)

Treatment combinations: (2 × 3 × 3) = 18

Post-hoc test was conducted for levels of irrigation. Post-hoc tests are nothing but the significant tests applied after analysis of variance. It is the lsd test based on 't' statistic. Here in this case for the significant differences between L₁, L₂, L₃, the CD value given at 5% could be utilized. Difference between L₁ & L₂ > CD for indication of significance. Similarly the differences between L₁ & L₃, L₂ & L₃ are to be considered.

Irrigation scheduling:

Irrigation was given based on open pan evaporation reading for non-rainy period crops i.e., 3rd and 4th crops of 5 crops annual schedule for both the years (1998-2000) presented as 1st and 2nd crops respectively. For drip and chapin tape method, irrigation was given daily at three levels (0.3 Epan, 0.6 Epan and 0.9 Epan) and for furrow method, irrigation was given once in seven days at three levels (0.3 CPE, 0.6 CPE and 0.9 CPE) cumulating the Epan values for previous seven days. The units of 0.3, 0.6 and 0.9 cumulative pan evaporation/ pan evaporation means 30%, 60% and 90% of open pan evaporation reading.

Farmyard manure and chemical fertilizers were applied and cultural practices were attended as per the package of practices recommended for mulberry under irrigated conditions (Bongale, 1994; Jolly, 1987). Harvesting was done by pruning, following the step up method with a basal height of 30 cm from the ground. Leaf yield was recorded by harvesting all the plants of the micro plots and the yield computed as kg/ha.

Actual evapotranspiration (AET) by the crop which depends upon the availability of the moisture in the soil has been calculated using the procedure adopted by Frere and Popov (1979) (FAO water balance method).

$$AET = (S_i - 1) - S_i + P_i - D - R$$

Where AET = Actual evapo-transpiration (mm)

S_i = water retained (mm) in the soil at the end of i^{th} day

S_{i-1} = water available (mm) at the beginning of i^{th} day

P_i = irrigation or rainfall

D = infiltration

R = runoff

In order to determinate actual evapo-transpiration, soil moisture readings were collected at three depths (0-30 cm, 30-60 cm and 60-90 cm) in 18 plots out of total 54 plots by using troxler moisture meter. Each plot represented one treatment combination (plant spacing × methods of irrigation × levels of irrigation). During the 1st year soil moisture data was collected for second crop of non-rainy period (upto 40 days after pruning) and during the 2nd year for both first and second crops (upto 60-70 days after pruning) of non-rainy period. Soil moisture reading collected for three depths were pooled to calculate water available capacity, water storage and actual evapo-transpiration based on relationships.

Water available capacity (mm) = Field capacity (mm) – Permanent wilting point (mm)

Available water in a particular day (mm) = Water storage (mm) – Permanent wilting point (mm)

Water storage (mm) = Soil moisture % (vol.)/100 × depth (cm) × 10

In furrow method soil moisture reading was taken just before irrigation and one day after irrigation.

RESULTS

Actual evapo-transpiration (Tables I & II):

Among the plant spacings, highest AET was recorded in 60 × 60 cm (3.58 mm) and lowest was recorded in 120 × 60 cm spacing (3.46 mm). Among the methods of irrigation, highest AET was recorded in drip methods (4.06 mm) followed by Chapin tape method (3.98 mm) followed by furrow method (2.53 mm).

Among the levels of irrigation, highest AET was recorded in 0.9 CPE/Epan (4.65 mm) followed by 0.6 CPE/Epan (3.47 mm) and lowest was recorded in 0.3 CPE/Epan (2.45 mm). Among the treatment combination highest AET was recorded in 60 × 60 cm spacing + drip method + 0.9 Epan (5.39 mm) and lowest in 120 × 60 cm plant spacing + furrow method + 0.3 Epan (1.55 mm). Treatment differences in plant spacings and levels of irrigation were highly significant, while methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. Highly significant interactions were recorded for spacing × methods of irrigation, while spacing × levels of irrigation, methods × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation were non-significant.

Table I. Actual evapotranspiration (mm / day) as influenced by methods and levels of irrigation at different plant spacings in mulberry.

Tableau I. Evapo-transpiration réelle (mm / jour) sous l'influence des méthodes et des niveaux d'irrigation avec différents espacements des plants de mûrier.

Sl. No.	Particulars	1998-99	1999-2000		Average
		II Crop	I Crop	II Crop	
No. de série	Données	1998-99	1999-2000		
		Récolte II	Récolte I	Récolte II	Moyenne
Main treatments (Spacing)					
<i>Traitements principaux (Espacement)</i>					
1	S1 (60 × 60 cm)	3.28	3.35	4.12	3.58
2	S2 (120 × 60 cm)	3.12	3.03	4.24	3.46
Sub treatments (Methods of Irrigation)					
<i>Sous-traitements (Méthodes d'irrigation)</i>					
1	I1 (Furrow / Sillon)	2.21	2.74	2.85	2.53
2	I2 (Drip / Goutte à goutte)	3.67	3.71	4.85	4.06
3	I3 (Chapin tape / Ruban Chapin)	3.71	3.61	4.66	3.98
Sub-sub treatments (Levels of irrigation)					
<i>Sous-sous traitements (Niveaux d'irrigation)</i>					
1	L1 (0.3 CPE/Epan)	1.74	2.18	3.43	2.45
2	L2 (0.6 CPE/Epan)	3.14	3.11	4.16	3.47
3	L3 (0.9 CPE/Epan)	4.72	4.28	4.96	4.65

Table II. Mean AET (Actual evapo-transpiration) and leaf yield as influenced by methods and levels of irrigation at different plant spacing in mulberry.

Tableau II. AET (évapo-transpiration réelle) et rendement foliaire moyens sous l'influence des méthodes et des niveaux d'irrigation avec différents espacements des plants de mûrier.

Particulars	AET (mm/day) (Average of three crops)	Leaf yield (kg/ha) (Average of four crops)
Données	AET (mm / jour) (Moyenne de trois récoltes)	Rendement foliaire (kg / ha) Moyenne de quatre récoltes
Main treatments (Spacing)		
<i>Traitements principaux (Espacement)</i>		
S1 (60 × 60 cm)	3.58	10,090
S2 (120 × 60 cm)	3.46	8,709
F test	*	*
CD at 5%	0.06	563
Sub treatments (Methods of irrigation)		
<i>Sous-traitements (Méthodes d'irrigation)</i>		
I1 (Furrow / Sillon)	2.53	9,133
I2 (Drip / Goutte à goutte)	4.06	9,564
I3 (Chapin tape / Ruban Chapin)	3.98	9,501
F test	NS	NS
CD at 5%	-	-
Sub-sub treatments (Levels of irrigation)		
<i>Sous-sous traitements (Niveaux d'irrigation)</i>		
L1 (0.3 CPE/Epan)	2.45 (1.02)	8,496 (929)
L2 (0.6 CPE/Epan)	3.47 (2.20)	9,425 (1782)
L3 (0.9 CPE/Epan)	4.65 (1.18)	10,278 (853)
F test	*	*
CD at 5%	0.92	325
Interactions		
<i>S × I (Main × Sub treatments / Traitements principaux × sous traitements)</i>		
F test	*	*
CD at 5% / DC à 5 %	0.14	697
<i>S × L (Main × Sub-sub treatments / Traitements principaux × Sous-sous traitements)</i>		
F test	NS	NS
<i>I × L (Sub × Sub-sub treatments / Sous traitements × sous-sous traitements)</i>		
F test	NS	NS
<i>S × I × L (Main × Sub × Sub treatments / Traitements principaux × sous × sous traitements)</i>		
F test	NS	NS

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

Figures in parenthesis are post-hoc test values indicates the difference between L₁ & L₂, L₁&L₃ and L₂ & L₃ respectively > CD values. / Les nombres entre parenthèses sont les valeurs du test post-hoc et indiquent respectivement la différence entre L₁ & L₂, L₁ & L₃ et L₂ & L₃ > aux valeurs DC.

Leaf yield (Tables I & II):

Among the main effects, the highest leaf yield was recorded in 60 × 60 cm spacing (10,090 kg/ha of crop), drip irrigation (9,564 kg/ha of crop) and 0.9 CPE/Epan (10,278 kg/ha of crop) compared to other treatments. Treatment differences in plant spacings and levels of irrigation were highly significant, while methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. Highly significant interactions were recorded for spacing × methods of irrigation, while spacing × levels of irrigation, methods × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation were non-significant.

Post-hoc test for level of irrigation:

In case of AET the difference between L₁ & L₂, L₁ & L₃ and L₂ & L₃ are 1.02 mm/day, 2.2mm/day and 1.18mm/day respectively, which were greater than CD values (0.92). In case of leaf yield the difference between L₁ & L₂, L₁ & L₃ and L₂ & L₃ were 929kg/ha, 1782kg/ha and 853kg/ha respectively, which were greater than CD values (325). Here it is found that each treatment among L₁, L₂, L₃, are different. The highest value obtained is from L₃. Hence L₃ is significantly higher than L₂ and L₂ is significantly higher than L₁.

DISCUSSIONS

In the present study, in drip and chapin tape methods, irrigation was given at 0.3 Epan, 0.6 Epan and 0.9 Epan as 0.145 ha-cm, 0.29 ha-cm and 0.435 ha-cm respectively. In furrow method, irrigation was given at 0-3 CPE, 0.6 CPE and 0.9 CPE as 1.02 ha-cm, 2.03 ha-cm and 3.05 ha-cm respectively. Results obtained indicated that among the spacings 60 × 60 cm showed the highest AET. Among the methods of irrigation the highest AET was observed in drip method than in Chapin tape method and furrow method. Among the levels of irrigation, the highest AET was obtained in 0.9 CPE/Epan. Kundu *et al.* (1992) studied the effect of different levels of irrigation and evapo-transpiration control measures on growth and leaf yield of mulberry. Irrigation had significant influence on the leaf yield of mulberry and irrigation at IW(Irrigation Water)/CPE(Cumulative Pan Evaporation) ratio of 1.5 produced the maximum leaf yield, which was however, on par with irrigation at IW/CPE ratio of 1.0. Evapo-transpiration control measures improved leaf yield considerably over control treatments.

In the present study at all the levels of irrigation the highest actual evapo-transpiration values were recorded in the plots having micro-irrigation system (drip and chapin tape) due to daily irrigation. The lowest AET values recorded in the plots having furrow irrigation are due to weekly irrigation and also percolation losses in this method. In all the three crops, actual evapo-transpiration was the lowest during the early stage of the growth period of crop and increased with later. It indicated that the actual evapo-transpiration is directly related to soil moisture content and crop canopy development. The recorded leaf yield was in direct proportion to AET values. Ramakanth and Naoit (1995) studied the transpiration characteristics of mulberry plants and reported that the value of length of shoot was higher in the pots with two plants than in these with one plant during the first two months period of growth. In the three months old saplings shoot length value was much higher in the pot with one plant. Evapo-transpiration in the pots with one plant amounted to 33,240 ml and in the pots with two plants 38,024 ml. Evaporation from the soil surface of the pots without plants amounted to 10,128 ml. It is possible to conclude, that among the spacings, 60 × 60 cm showed the highest AET. Among methods of irrigation highest AET was observed in drip method than in Chapin tape method and furrow method. Among levels of irrigation, the highest AET was obtained in 0.9 CPE/Epan. Among treatment combinations the highest AET was observed in drip irrigation with 60 × 60 cm spacing at 0.9 Epan compared to others. Here AET values obtained were in direct proportion to leaf yield. It showed that the efficiency of drip irrigation was better in 60 × 60 cm spacing i.e. 30-60 % saving of irrigation water with an increase of 19 % leaf yield over furrow method of irrigation i.e. the actual evapo-transpiration is directly related to plant spacing, methods and levels of irrigation.

The study revealed that the micro irrigation systems (drip and chapin tape) recorded highest AET values associated with yield improvement compared to furrow method.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the authorities of the Institute for the facilities, and Statistical Officer for the statistical analysis.

REFERENCES

- BONGALE U.D. (1994) Fertilizers in mulberry cultivation. Pushpa Seri Pub., Thalaghattapura, Bangalore-62, India. pp. 140.
- BONGALE U.D. (2001) Advances in tropical mulberry production technology. Advances in Tropical Sericulture (Proceedings of NSTS-99), pp. 5-10.
- FRERE M. & POPOV G. F. (1979) Agrometeorological crop monitoring and Forecasting. FAO, Plant Prod. Prot. Paper No. 17, FAO, Rome, pp.64.
- JOLLY M.S. (1987) Appropriate Sericulture Techniques, CSR & TI, Mysore, pp. 172.
- KOKDE J. R. (1985) Agricultural climatology, Metropolitan Book Co. Pvt. Ltd., Nethaji Subhash Marg, New Delhi-110 002, India, pp.387.
- KUNDU C., MANDAL B.B., JANA P.K. & SINHA A.C. (1992) Effect of irrigation and evapo-transpiration control measures on growth and leaf yield of mulberry under Terai regions of Eastern India. In : Nat. Conf. Mulberry Seric. Res., CSR&TI, Mysore, Dec. 10-11, pp. 25.
- LENKA D. (1991) Irrigation and Drainage. Kalyani publishers, First Edition, New Delhi – Ludhiana, India, pp.339.
- MURALIDHARA H. R., GUNDURAO D. S., SARPESHKAR A. M. & RAMAIAH R. (1994) Is drip irrigation viable for mulberry cultivation. An economic analysis. Mysore J. Agric. Sci., 28: 256-260.
- RAJEGOWDA M.B., MURALIDHARA K.S., RAVINDRABABU B.T., GURUPRASANNA H.L. & NAGARAJ A.P. (2003) Water balance technique to optimize the plant population of mango in dry land horticulture. J. Agrometeorology., 5(1) : 93-96.
- RAMAKANT & NAOIT (1995) Studies on the transpiration characteristics of mulberry plants – I. Water requirement and evapotranspiration coefficient of potted mulberry plants. Bull. Nat. Inst. Seric. & Entomol. Sci., 12(3): 1-12 (J).
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R. & JOLLY M.S. (1976) Manuals on Sericulture, Vol. 1, Mulberry Cultivation, FAO Agric. Services Bull., 15/1, Rome, pp. 150.
- SARATCHANDRA B., RAJANNA L., PARAMESHA C., JAYAPPA T., SUBITHA M.G., PHILOMENA K. L. & RAMESH S.P. (1992) Studies on the comparative efficiency of drip, sprinkler and furrow irrigation systems on mulberry leaf yield and water economy. Sericologia, 32(1): 95-100.
- SAVANI M.B, PATEL K.K., SAIKH A.M., CHINCHGHARE R.B. & PARMAR R.S.(1994) Relationship between actual evapo-transpiration and estimated evapo-transpiration of a reference crop of indian mustard (*Brassica juncea*) and green gram (*Phaseolus radiatus*). Indian J. of Agricultural Sciences, 64(11): 768-770.
- SHANKAR M.A., DEVAIAH M.C., PARAMESHBABU V., CHOWDEGOWDA M., CHINNASWAMY K.P. & JANARJUNA S. (1996) Comparative performance of drip irrigation systems in mulberry. Proceedings of All India seminar on modern irrigation techniques. pp.151-154.
- SIDDALINGASWAMY N., BONGALE U. D., NARAYANGOWDA S. N. & SHIVAPRAKASH R. M. (2004) A study on the suitability of micro irrigation systems on mulberry leaf yield and silkworm rearing. Sericologia, 44(3): 361- 367.

UMAMAHESWARARAO V., DIWAN SINGH & RAJSINGH (1994) Actual evapo-transpiration in indian mustard (*Brassica juncea*) and green gram (*Phaseolus radiatus*). Indian J. of Agricultural Sciences, 64(9): 650-652

ETUDES DE L'EFFET DES METHODES ET DES NIVEAUX D'IRRIGATION AVEC DIFFERENTS ESPACEMENTS DES PLANTS SUR L'ÉVAPO-TRANSPIRATION REELLE DU MURIER

N. SIDDALINGASWAMY¹, U. D. BONGALE¹, M. B. RAJEGOWDA²,
S. N. NARAYANGOWDA¹ & R. M. SHIVAPRAKASH¹

1. Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghatappura, Bangalore – 560 062, Karnataka, Inde.
2. Department of Agrometeorology, University of Agricultural Sciences, Bangalore 560 065, Karnataka, Inde.

Nous avons réalisé une expérience sur le terrain avec différentes méthodes d'irrigation (sillons, goutte à goutte et ruban Chapin) avec trois niveaux à savoir 0,3 ; 0,6 et 0,9 d'évaporation cumulative à la bassine (CPE) / d'évaporation à la bassine (Epan) avec deux espacements des plants (60 × 60 cm et 120 × 60 cm) de mûrier M-5 en 1998-2000, avec un total de dix récoltes pendant la période. Cela couvre quatre récoltes expérimentales pendant la saison sèche. On procède aux relevés des niveaux d'eau dans le sol pour les trois récoltes expérimentales afin de déterminer l'évapo-transpiration réelle (AET) par la méthode du bilan hydrique. Parmi les traitements principaux, on enregistre l'AET la plus élevée avec l'espacement des plants de 60 × 60 cm (3,58 mm / jour), parmi les sous-traitements on enregistre l'AET la plus élevée avec l'irrigation au goutte à goutte (4,06 mm / jour) et parmi les sous-sous traitements l'AET la plus élevée avec 0,9 CPE / Epan (4,65 mm / jour). Parmi les interactions, on obtient l'AET la plus élevée avec la combinaison de traitement de 60 × 60 cm + méthode du goutte à goutte + 0,9 Epan (5,39 mm / jour). L'étude révèle que les systèmes de micro-irrigation (goutte à goutte et ruban Chapin) enregistrent les valeurs AET les plus élevées, associées à une amélioration du rendement par comparaison à la méthode des sillons.

INTRODUCTION

Le mûrier est l'unique plante hôte du ver à soie (*Bombyx mori* L.) et on le cultive principalement pour son feuillage (comme nourriture pour le ver à soie). On considère que la maximisation du rendement foliaire et l'amélioration de la qualité de la feuille sont les étapes les plus importantes pour améliorer la production de cocons. Le mûrier est une plante pérenne à racines profondes qui produit beaucoup de biomasse. Il est cultivé dans les pays tropicaux pendant toute l'année, dans une vaste gamme de conditions climatiques allant de tropicales à tempérées. On sait qu'une fourchette de température modérée de 24 à 28° C est optimale pour la croissance végétative du mûrier, qui peut être cultivé dans les endroits avec une fourchette de précipitations allant de 600 mm à 2500 mm, une fourchette d'humidité de 65 à 80 % et un ensoleillement de 9 à 13 heures par jour (Rangaswamy et coll., 1976).

Le manque d'apport adapté en eau est l'un des principaux facteurs limitant la production des cultures dans les régions arides et semi-arides. Il faut donc décider de la gestion de l'eau pour la culture, sur la base du besoin en eau nécessaire pour l'évapo-transpiration réelle (Savani et coll., 1994). Une des manières d'améliorer la gestion de l'irrigation est d'avoir recours à une méthode fiable

de détermination de l'évapo-transpiration, puisque c'est ce processus physique qui épuise principalement les réserves d'eau du sol. Cette information sur l'évapo-transpiration, son ratio avec l'évaporation à partir d'une bassine ouverte et l'efficacité des cultures à utiliser l'évapo-transpiration sont très utiles pour planifier les opérations culturales et le calendrier d'irrigation (Umamaheswara Rao et coll., 1994). En général, l'évapo-transpiration augmente avec l'âge de la culture, atteint un maximum pendant la floraison en raison de la canopée maximum, se maintient à ce niveau pendant un certain temps et baisse progressivement après, en raison de la sénescence de la culture et de la perte des feuilles (Lenka, 1991). Les études sur l'évapo-transpiration permettent aussi de concevoir des projets d'irrigation pour les besoins saisonniers et annuels, de concevoir un système d'irrigation dans une exploitation, avec un taux d'utilisation maximum de l'eau et de prévoir le moment de l'irrigation et la quantité d'eau à chaque fois, avec une précision raisonnable. L'irrigation signifie que l'on doit savoir combien, comment, et quand appliquer l'eau. Dans ce but, les estimations de l'évapo-transpiration permettent de connaître les besoins au cours des différentes étapes de culture et pendant les différentes saisons ou conditions climatiques. Dans les systèmes de culture, il est aussi utile d'étudier les modèles de l'évapo-transpiration. On peut calculer l'évapo-transpiration réelle et la carence en eau en ayant recours au bilan hydrique ou à une approche par répartition (Kokde, 1985). Rajegowda et d'autres (2003) ont conçu la technique du bilan hydrique pour optimiser la population de plants de manguiers dans le cadre de l'horticulture en terres sèches.

Sous des conditions tropicales, surtout dans les zones chaudes arides et semi-arides, le taux de transpiration dépasse normalement le taux d'absorption. Cela entraîne un stress en eau, qui a un effet négatif sur le système physiologique de la plante. Malgré cette limitation, on n'a pas accordé l'attention nécessaire à la mise au point des conditions de microclimat optimales pour la culture du mûrier, si vitales, surtout sous un climat tropical (Bongale, 2001). Quelques études disponibles sur le mûrier ont montré qu'il est possible d'économiser 45 à 60 % d'eau, en adoptant l'irrigation au goutte à goutte à la place de l'irrigation par les sillons (Muralidhara, 1994 ; Saratchandra et coll., 1992 ; Shankar et coll., 1996 et Siddalingaswamy et coll., 2004). Cependant, il n'existe pas d'études traitant de l'évapotranspiration réelle chez le mûrier avec les diverses méthodes / technologies d'irrigation. Nous avons donc entrepris cette étude.

MATERIELS ET METHODES

On a réalisé une étude sur le terrain au *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute* pendant 3 ans (1997 – 2000) avec une plantation de mûriers M5 de quatre ans, plantés en 1994. On considère la première année de la période d'étude comme l'année d'établissement. Sur un ensemble de dix récoltes pendant deux années consécutives (1998-2000), on observe quatre récoltes expérimentales (deux chaque année) pendant la période sèche. Le sol est du terreau d'argile sablonneux rouge avec un pH de 7,55 et une conductivité électrique de 0,47 dS/m. La capacité du terrain de 0 à 90 cm est de 24,2 % et le point de flétrissure permanent est de 14,5 % (méthode avec un appareil de pression des membranes par plaques) et la densité apparente est de 1,47 g/cc (méthode d'échantillon central). L'expérience est conçue selon une parcelle divisée avec 18 combinaisons de traitements, répétées chacune trois fois. Les détails du traitement sont les suivants :

Traitements principaux : Espacements des plants (2) :

S1 (60 × 60 cm)

S2 (120 × 60 cm)

Sous-traitements : Méthodes d'irrigation (3) :

I1 (Méthode des sillons)

I2 (Méthode du goutte à goutte)

I3 (Méthode du ruban chapin)

Sous-sous traitements : Niveaux d'irrigation (3) :
 L1 (0,3 d'Evaporation Cumulative à la bassine (CPE)
 / évaporation à la bassine (Epan)
 L2 (0,6 CPE / Epan)
 L3 (0,9 CPE / Epan)

(CPE - pour la méthode des sillons et Epan –pour la méthode du goutte à goutte et du ruban Chapin

Combinaisons de traitements : $(2 \times 3 \times 3) = 18$

On procède au test post-hoc pour les niveaux d'irrigation. Les tests post-hoc sont les tests de signification appliqués après l'analyse de variance. C'est le test « lsd » basé sur les statistiques « t ». Ici, on pourrait utiliser la valeur DC à 5 % pour les différences significatives entre L1, L2, L3 et la différence entre L1 et L2 > DC pour l'indication de la signification. De même, il faut prendre en considération les différences entre L1 et L3, L2 et L3.

Calendrier d'irrigation :

On procède à l'irrigation d'après le relevé de l'évaporation ouverte à la bassine pour les récoltes de la saison sèche, c'est-à-dire pour les 3^{ème} et 4^{ème} récoltes, des 5 récoltes du calendrier annuel, pendant les deux années (1998-2000), présentées respectivement comme la 1^{ère} et la 2^{ème} récolte. Pour la méthode du goutte à goutte et du ruban Chapin, on procède à une irrigation quotidienne à trois niveaux (0,3 Epan, 0,6 Epan et 0,9 Epan) et pour la méthode des sillons, on procède à une irrigation une fois par semaine à trois niveaux (0,3 CPE ; 0,6 CPE et 0,9 CPE) en cumulant les valeurs Epan des sept jours précédents. Les unités d'évaporation cumulative à la bassine de 0,3 ; 0,6 et 0,9 signifient un relevé d'évaporation ouverte à la bassine de 30 %, 60 % et 90 %.

On procède à l'application de fumier de ferme, des engrais chimiques et aux opérations culturales, d'après les pratiques recommandées pour le mûrier dans des conditions d'irrigation (Bongale, 1994 ; Jolly, 1987). On procède à la récolte en taillant, en suivant la méthode par paliers avec une hauteur de base à 30 cm du sol. On enregistre le rendement foliaire en recueillant tous les plants des micro-parcelles et on calcule le rendement en kg / ha.

On calcule l'évapo-transpiration réelle (AET) de la culture qui dépend de la disponibilité de l'eau dans le sol, en utilisant la procédure adoptée par Frere et Popov (1979) (méthode du bilan hydrique de la FAO).

$$AET = (S_x - 1) - S_x + P_x - D - R$$

Où AET = Evapo-transpiration réelle (mm)

S_x = eau retenue (mm) dans le sol à la fin du $x^{\text{ème}}$ jour

$S_x - 1$ = eau disponible (mm) au début du $x^{\text{ème}}$ jour

P_x = irrigation ou précipitation

D = infiltration

R = ruissellement

Pour déterminer l'évapo-transpiration réelle, on recueille les relevés d'humidité dans le sol à trois profondeurs (0 à 30 cm, 30 à 60 cm et 60 à 90 cm) dans 18 parcelles, sur un total de 54 parcelles, en utilisant un appareil de mesure troxler. Chaque parcelle représente une combinaison de traitement (espacement des plants × méthodes d'irrigation × niveaux d'irrigation). Pendant la première année, on recueille les données sur l'humidité du sol pour la deuxième récolte pendant la saison sèche

(jusqu'à 40 jours après la taille) et pendant la 2^{ème} année à la fois pour la première et pour la deuxième récolte (jusqu'à 60 à 70 jours après la taille) pendant la saison sèche. On regroupe les relevés de l'eau dans le sol recueillis pour les trois profondeurs pour calculer la capacité d'eau disponible, le stockage de l'eau et l'évapo-transpiration réelle d'après les relations.

Capacité d'eau disponible (mm) = Capacité du terrain (mm) – point de flétrissure permanent (mm)

Eau disponible un jour particulier (mm) = Stockage de l'eau (mm) – point de flétrissure permanent (mm)

Stockage de l'eau (mm) = % d'eau dans le sol (vol.) / 100 × profondeur (cm) × 10

Avec la méthode des sillons, on procède au relevé de l'eau dans le sol juste avant l'irrigation et un jour après l'irrigation.

RESULTATS

Evapo-transpiration réelle : (Tableaux I et II) :

Pour les espacements des plants, on enregistre l'AET la plus élevée avec 60 × 60 cm (3,58 mm) et la plus faible avec un espacement de 120 × 60 cm (3,46 mm). Pour les méthodes d'irrigation, on enregistre l'AET la plus élevée avec les méthodes du goutte à goutte (4,06 mm), suivie par la méthode du ruban Chapin (3,98 mm), suivie par la méthode des sillons (2,53 mm).

Pour les niveaux d'irrigation, on enregistre l'AET la plus élevée avec 0,9 CPE / Epan (4,65 mm), suivie par 0,6 CPE / Epan (3,47 mm) et la plus faible avec 0,3 CPE / Epan (2,45 mm). Parmi les combinaisons de traitement, on enregistre l'AET la plus élevée avec l'espacement de 60 × 60 cm + méthode du goutte à goutte + 0,9 Epan (5,39 mm) et la plus faible avec l'espacement des plants de 120 × 60 cm + méthode des sillons + 0,3 Epan (1,55 m). Les différences avec les espacements des plants et les niveaux d'irrigation sont très significatives, tandis qu'on enregistre des différences non significatives pour les méthodes d'irrigation. On enregistre des interactions très significatives pour les espacements × méthodes d'irrigation, tandis que les espacements × niveaux d'irrigation, les méthodes × niveaux d'irrigation et les espacements × méthodes × niveaux d'irrigation ne sont pas significatifs.

Rendement foliaire (Tableaux I & II) :

Parmi les principaux effets, on enregistre le rendement foliaire le plus élevé avec l'espacement de 60 × 60 cm (10 090 kg / ha de récolte), l'irrigation au goutte à goutte (9 564 kg / ha de récolte) et 0,9 CPE / Epan (10 278 / kg de récolte) par comparaison aux autres traitements. Les différences avec les espacements des plants et les niveaux d'irrigation sont très significatives, tandis que les méthodes d'irrigation enregistrent des différences non significatives. On enregistre des interactions très significatives pour les espacements × méthodes d'irrigation tandis que les espacements × niveaux d'irrigation, les méthodes × niveaux d'irrigation et les espacements × méthodes × niveaux d'irrigation ne sont pas significatifs.

Test post-hoc pour le niveau d'irrigation :

Dans le cas de l'AET, les différences entre L1 et L2, L1 et L3 et L2 et L3 sont respectivement de 1,02 mm / jour, de 2,2 mm / jour et de 1,8 mm / jour, qui sont plus élevées que les valeurs DC (0,92). Dans le cas du rendement foliaire, les différences entre L1 et L2, L1 et L3 et L2 et L3 sont respectivement de 929 kg / ha, de 1782 kg / ha et de 853 kg / ha, qui sont plus que les valeurs DC (325). Ici, on trouve que chaque résultat entre les traitements L1, L2, L3 est différent. On obtient la

valeur la plus élevée avec L3. L3 est donc significativement plus élevée que L2 et L2 est significativement plus élevée que L1.

DISCUSSION

Dans cette étude, avec les méthodes du goutte à goutte et du ruban Chapin, on procède à une irrigation à 0,3 Epan, 0,6 Epan et 0,9 Epan à respectivement 0,145 ha – cm, 0,29 ha – cm et 0,435 ha – cm. Avec la méthode des sillons, on procède à une irrigation à 0,3 CPE, 0,6 CPE et 0,9 CPE à respectivement 1,02 ha-cm, 2,03 ha-cm et 3,05 ha-cm. Les résultats obtenus indiquent que parmi les espacements, 60 × 60 cm présente l'AET la plus élevée. Entre les méthodes d'irrigation, on observe l'AET la plus élevée avec la méthode du goutte à goutte, plus qu'avec la méthode du ruban Chapin et la méthode des sillons. Entre les niveaux d'irrigation, on obtient l'AET la plus élevée avec 0,9 CPE / Epan. Kundu et coll., (1992) ont étudié l'effet des différents niveaux d'irrigation et des mesures de contrôle de l'évapo-transpiration sur la croissance et le rendement foliaire du mûrier. L'irrigation a une influence significative sur le rendement foliaire et l'irrigation à un ratio IW (Eau d'Irrigation) / CPE (Evaporation Cumulative à la Bassine) de 1,5 donne le rendement foliaire maximum, qui est cependant, à égalité avec une irrigation avec un ratio IW / CPE de 1. Les mesures de contrôle de l'évapo-transpiration améliorent considérablement le rendement foliaire par rapport aux traitements témoins.

Dans cette étude, avec tous les niveaux d'irrigation, on enregistre les valeurs d'évapo-transpiration réelle les plus élevées pour les parcelles avec un système de micro-irrigation (goutte à goutte et ruban Chapin), car l'irrigation est quotidienne. Les valeurs AET les plus faibles enregistrées pour les parcelles irriguées par sillons, sont dues à l'irrigation hebdomadaire et aussi aux pertes dues au ruissellement avec cette méthode. Pour les trois récoltes, l'évapo-transpiration réelle est la plus faible au début de la période de croissance de la culture et elle augmente plus tard. Cela indique que l'évapo-transpiration réelle est directement liée à la teneur en humidité du sol et au développement de la voûte des cultures. Le rendement foliaire enregistré est en proportion directe avec les valeurs AET. Ramakanth et Naoit (1995) ont étudié les caractéristiques de transpiration des plants de mûrier et rapporté que la valeur de la longueur de la pousse est plus élevée dans les pots avec deux plants que dans ceux avec un plant, pendant les deux premiers mois de la période de croissance. Chez les plantules de trois mois, la valeur de la longueur de la pousse est beaucoup plus élevée dans le pot avec un plant. L'évapo-transpiration dans les pots avec un plant s'élève à 33,240 ml et dans les pots avec deux plants à 38,024 ml. L'évaporation à partir de la surface du sol pour les pots sans plant s'élève à 10,128 ml. Il est possible de conclure, qu'entre les espacements, 60 × 60 cm présente l'AET la plus élevée. Parmi les méthodes d'irrigation, on observe une AET plus élevée avec la méthode du goutte à goutte qu'avec la méthode du ruban Chapin et qu'avec la méthode des sillons. Parmi les niveaux d'irrigation, on obtient l'AET la plus élevée avec 0,9 CPE / Epan. Parmi les combinaisons de traitement, on observe l'AET la plus élevée avec l'irrigation au goutte à goutte avec un espacement de 60 × 60 cm avec 0,9 Epan. Les valeurs AET obtenues ici sont en proportion directe avec le rendement foliaire. Cela montre une meilleure efficacité de l'irrigation au goutte à goutte avec un espacement de 60 × 60 cm, soit 30 à 60 % d'économie d'eau d'irrigation, avec une augmentation du rendement foliaire de 19 %, par rapport à la méthode d'irrigation par les sillons, ce qui signifie que l'évapo-transpiration réelle est directement liée à l'espacement des plants, aux méthodes et aux niveaux d'irrigation. L'étude révèle que les systèmes de micro-irrigation (goutte à goutte et ruban chapin) enregistrent des valeurs AET plus élevées, associées à une amélioration du rendement par comparaison à la méthode des sillons.

EFFECT OF FORTIFICATION OF LEAVES OF *TERMINALIA TOMENTOSA* WITH SECONDARY NUTRIENTS TO TASAR SILKWORM *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

U. S. P. SINHA*, S. DAS, J. PRASAD, S. K. CHAUDHARY & N. SURYANARAYANA

Central Tasar Research & Training Institute, P.O. Piska Nagri, Ranchi- 835303, Jharkhand (India).

Studies on the effect of fortification of leaves of Terminalia tomentosa with different secondary nutrients in different concentrations to tasar silkworm Antheraea mylitta Drury revealed that among the ten treatments under study, fortification of leaves with Magnesium sulphate (2%, w/v) is most effective in improving the commercial characters of cocoons of Antheraea mylitta Drury. Under this treatment larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight and silk ratio percent increased by 33.32, 33.33, 31.33 & 31.05 % respectively as compared to control.

Keywords: Fortification, *Terminalia tomentosa*, secondary nutrient, *Antheraea mylitta*.

INTRODUCTION

Terminalia tomentosa is one of the primary food plants of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury (Jolly *et al.*, 1968). The silkworm derives nutrients required for its growth from the food plant leaf. Hence, the growth and development of the silkworms and economic characters of cocoons produced by them are greatly influenced by the nutritional contents of leaves. Several studies have been carried out to improve the quality and quantity of leaves of tasar food plants through application of major and micronutrients (Sinha *et al.*, 1999, 2002 & 2006). It has been reported by Shankar *et al.*, (1994) that deficiency of secondary nutrients adversely affects the larval growth of mulberry silkworm *Bombyx mori* L. and its cocoon quality. Radha *et al.*, (1988) have also found reduction in silkworm cocoon crop and silk filament due to feeding of mulberry leaf having sulphur deficiency. However, no work has so far been reported on the effect of fortification of leaves of *T. tomentosa* with secondary nutrients to tasar silkworm *A. mylitta*. The present study has been undertaken with a view to study the effect of supplementing secondary nutrients to *T. tomentosa* leaves and assesses its influence on larval growth and commercial characters of cocoons of *A. mylitta*.

MATERIALS AND METHODS

Freshly hatched larvae of *Antheraea mylitta* were reared indoor from first to fifth instar on *T. tomentosa* leaves fortified with 1%, 2% and 3% concentrations of secondary nutrients as given during first (July -Aug.) and second (Sept.- Oct.) rearing seasons as per method described by Rana *et al.*, (1987). Simultaneously, a control (without secondary nutrients) was also maintained. Treatments were replicated three times and consisted of 100 worms of uniform size.

* Author to whom correspondence may be addressed

Treatments:

- T₁ - Calcium chloride (1%, w/v),
- T₂ - Calcium chloride (2%, w/v)
- T₃ - Calcium chloride (3%, w/v),
- T₄ - Calcium sulphate (1%, w/v)
- T₅ - Calcium sulphate (2%, w/v),
- T₆ - Calcium sulphate (3% w/v)
- T₇ - Magnesium sulphate (1%, w/v),
- T₈ - Magnesium sulphate (2%, w/v)
- T₉ - Magnesium sulphate (3%, w/v),
- T₁₀ - Control (without secondary nutrient)

Data on larval weight, effective rate of rearing (ERR) and cocoon characters were statistically analyzed. Method as suggested by Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) was followed to decide the ranking of the treatments in respect of the commercial characters under study.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of fortification of leaves of *T. tomentosa* with secondary nutrients in different concentrations to tasar silkworm *Antheraea mylitta* have been depicted in Table I. It is evident from the table that leaves of *T. tomentosa* fortified with secondary nutrients showed promotory effect over control in respect of all the characters i. e., larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight and silk ratio percentage in both the rearing seasons. This result corroborates with the findings of Shankar *et al.*, (1994) who also observed that secondary nutrients play an important role in silkworm larval growth, development, cocoon weight and silk quality. Among the ten treatments under study, treatment T₈ was found most effective in increasing the larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight and silk ratio percentage followed by treatment T₄. Under treatment T₈ i.e. fortification of leaves with Magnesium sulphate (2%, w/v), larval weight, ERR, cocoon weight & silk ratio percentage increased by 33.32, 33.33, 31.33 & 31.05% respectively as compared to control. Bose *et al.*, (1995) reported that mineral contents stimulate the metabolic activities in silkworm resulting in quantitative improvement of cocoon and silk. Gunther (1981) concluded that about 300 enzyme reactions are influenced by Mg ions. When Magnesium is passed on to the silkworms, it accelerates the growth of silkworms through orientation of physiological activities. Moreover, Sulphur is known to have an important role in the synthesis of amino acids, proteins and vitamins. This may be the reason for improvement in commercial characters of cocoons due to fortification of leaves with Magnesium sulphate. Further, Viswanath and Krishnamurthy (1982) also found that silkworm larvae fed with Mg sprayed leaves resulted in better cocoon yield and cocoon weight. Results of Loknath and Shivashankar (1985) also support our findings. They observed that when leaves fortified with Magnesium (1.25 kg/ha) were fed to mulberry silkworms, it favourably influences the cocoon yield and shell percentage.

In treatment T₂ i.e. when rearing was conducted on the fortified leaves with Calcium chloride (2%, w/v), larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight and silk ratio increased by 24.63, 20.00, 24.48 and 24.62% respectively as compared to control. These findings are in agreement with the findings of Subburathinam and Chetty (1991) who reported that enrichment of mulberry leaves with Calcium chloride (1%) increases the cocoon characters - cocoon weight (11.42%), shell weight (16.75%) & silk ratio (6.7%). Besides, second rearing season seems to be more favourable than first rearing season in respect of all the characters taken into consideration. During second rearing season, larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight and silk ratio percentage increased by 5.35, 11.73, 2.78 & 1.59 % respectively as compared to first rearing season.

Data in table II indicate the scores allotted to ten different treatments of secondary nutrients under study for four characters i.e., larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight and silk ratio percentage by the method of Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) where lower values signify higher ranking. It is evident from this table that among ten different treatments under study, treatment T₈ (Magnesium sulphate- 2%, w/v) is the best treatment followed by T₂ (Calcium chloride- 2%, w/v).

Table I. Effect of fortification of leaves of *T. tomentosa* with secondary nutrients to tasar silkworm *A. mylitta* D.

Tableau I. Effet de la fortification des feuilles de *T. tomentosa* avec des nutriments secondaires sur le ver à soie tasar *A. mylitta* D.

Treatment	Larval weight		Effective rate of rearing		Cocoon weight		S.R. (%)	
Traitement	Poids larvaire (g)		Taux effectif d'élevage (%)		Poids du cocon (g)		R. S. (%)	
	Crop I Récolte I	Crop II Récolte II	Crop I Récolte I	Crop II Récolte II	Crop I Récolte I	Crop II Récolte II	Crop I Récolte I	Crop II Récolte II
T ₁	25.05 f	26.22 f	15.67 cd	18.00 bc	8.20 de	8.50 c	9.15 d	9.18 cd
T ₂	27.13 b	29.24 b	17.00 b	19.00 b	8.80 b	9.00 b	10.11 b	10.44 b
T ₃	25.21 f	26.13 f	15.33 d	17.67 c	8.10 e	8.30 c	9.26 d	9.16 d
T ₄	26.03 c	28.18 c	17.00 b	19.00 b	8.50 c	8.80 b	9.76 bc	10.11 b
T ₅	25.24 ef	26.05 f	15.67 cd	17.67 c	8.20 de	8.40 c	9.27 d	9.29 cd
T ₆	25.12 f	25.53 g	15.33 d	17.33 c	8.10 e	8.30 c	9.26 d	9.16 d
T ₇	25.44 de	26.82 e	16.33 bcd	18.00 bc	8.40 cd	8.40 c	9.40 cd	9.52 cd
T ₈	29.23 a	31.07 a	19.00 a	21.00 a	9.20 a	9.58 a	10.65 a	10.96 a
T ₉	25.62 d	27.11 d	16.67 bc	17.33 c	8.20 de	8.40 c	9.39 cd	9.53 c
T ₁₀ (Control) T10 (Témoin)	21.91 g	23.32 h	14.00 e	16.00 d	7.00 f	7.30 d	8.00 e	8.49 e
C.D.at 5%	0.22	0.24	1.32	1.25	0.24	0.23	0.44	0.36
D. C. à 5 %								
Grand mean	25.60	26.97	16.20	18.10	8.27	8.50	9.43	9.58
Moyenne totale								

Figures with different alphabets differ significantly / Les chiffres avec des lettres différentes diffèrent de manière significative.

$$\text{S.R. (\%)} = \frac{\text{Shell weight}}{\text{Cocoon weight}} \times 100$$

$$\text{R. S. (\%)} = \frac{\text{Poids de la coque}}{\text{Poids du cocon}} \times 100$$

Table II. Scores of ten different treatments of secondary nutrients for commercial characters of *A. mylitta*.Tableau II. Résultats de dix traitements différents de nutriments secondaires sur les caractères commerciaux d'*A. mylitta*.

Treatment	Larval weight		Effective rate of rearing		Cocoon weight		Silk ratio		Total scores		Grand total	Ranks
Traitement	Poids larvaire		Taux effectif d'élevage		Poids du cocon		Richesse soyeuse		Résultats totaux		Résultat final	Classements
	Crop I	Crop II	Crop I	Crop II	Crop I	Crop II	Crop I	Crop II	Crop I	Crop II		
	Récolte I	Récolte II	Récolte I	Récolte II	Récolte I	Récolte II	Récolte I	Récolte II	Récolte I	Récolte II		
T ₈	0.14	0.13	0.20	0.25	0.17	0.25	0.20	0.20	0.71	0.83	1.54	I
T ₂	0.29	0.25	0.40	0.50	0.33	0.50	0.40	0.40	1.42	1.65	3.07	II
T ₄	0.43	0.38	0.40	0.50	0.50	0.50	0.50	0.40	1.83	1.78	3.61	III
T ₉	0.57	0.50	0.50	0.75	0.75	0.75	0.70	0.60	2.52	2.60	5.12	IV
T ₇	0.64	0.63	0.60	0.63	0.58	0.75	0.70	0.80	2.52	2.81	5.33	V
T ₁	0.88	0.75	0.70	0.63	0.75	0.75	0.80	0.80	3.13	2.93	6.06	VI
T ₅	0.79	0.75	0.70	0.75	0.75	0.75	0.80	0.80	3.04	3.05	6.09	VII
T ₃	0.88	0.75	0.80	0.75	0.83	0.75	0.80	0.80	3.31	3.05	6.36	VIII
T ₆	0.88	0.88	0.80	0.75	0.83	0.75	0.80	0.80	3.31	3.18	6.49	IX
T ₁₀	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	4.00	4.00	8.00	X

Thus, it is inferred that fortification of leaves with Magnesium sulphate (2%, w/v) is the most effective in improving the commercial characters of cocoons of *Antheraea mylitta* Drury which has improved larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight and silk ratio percent by 33.32, 33.33, 31.33 & 31.05% respectively as compared to control.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their sincere thanks to Shri S. Rai for assistance in statistical analysis.

REFERENCES

- ARUNACHALAM V. & BANDYOPADHYAY A. (1984) A method to make decisions jointly on a number of dependent characters. *Indian J. Genet.*, 44(3): 413-424.
- BOSE P.C., SINGHVI N.R. & DUTTA R.K. (1995) Effect of micronutrients on the biochemical parameters of mulberry (*Morus alba* L.) leaf. *Sericologia*, 35(1): 65-69.
- GUNTHER TH. (1981) Biochemistry and pathobiochemistry of Magnesium. *Bull.3, H.1a*: 91-101.
- JOLLY M.S., CHATURVEDI S.N. & PRASAD S. (1968) A survey of tasar crops in India. *Indian J. Seric.*, 7(1): 56-57.
- LOKNATH R. & SHIVSHANKAR (1986) Effect of foliar application of micronutrients and magnesium on the growth, yield and quality of mulberry (*Morus alba* Linn.). *Indian J. Seric.*, 35 (1): 1-5.
- RADHA N.V., NAGARAJAN P. & JAYARAJ S. (1988) Mineral deficiency in mulberry plants, *Morus L.* and its effect on economic characters of silkworm, *Bombyx mori* L. *Madras Agric. J.*, 75: 384-390.
- RANA B., PRASAD B. & NIGAM M.P. (1987) Consumption and utilization of food by oak tasar silkworm *Antheraea proylei* Jolly (Lepi.: Satur.). *Sericologia*, 27: 11-19.
- SHANKAR M.A., SHIVSHANKAR K. & DEVAIAH M.C. (1994) Effect of feeding mulberry leaves deficient in secondary nutrients on larval growth, development, cocoon weight and silk quality. *Sericologia*, 34: 511-518.
- SINHA U.S.P., ISA M.D., SHRIVASTAVA D.P., SINHA A.K. & BRAHMACHARI B.N. (1999) Effect of different combinations of NPK fertilizers on the yield and nutritive value of *Terminalia arjuna*. *Sericologia*, 39(2): 291-298.
- SINHA U.S.P., ISA M.D., SINHA A.K. & BRAHAMCHARI B.N. (2002) Effect of different combinations of NPK fertilizers on the yield and nutritive value of *Terminalia tomentosa*. *Sericologia*, 42(2): 241-247.
- SINHA U.S.P., SINHA A.K., BANERJEE N.D., PRASAD J., CHAUDHARY S.K. & SURYANARAYANA N. (2006) Effect of micronutrients on the growth and leaf yield of *Terminalia arjuna*. *Sericologia*, 46(1): 127-132.
- SUBBURATHINUM K.M. & CHETTY S.J. (1991) Effect of fortification of mulberry leaves with minerals to silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 30: 121-123.
- VISWANATH A.P. & KRISHNAMURTHY K. (1982) Effect of foliar spray of micro-nutrients on the larval development and cocoon characters of silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 21-22: 1-6.

EFFET DE LA FORTIFICATION DES FEUILLES DE *TERMINALIA TOMENTOSA* AVEC DES NUTRIMENTS SECONDAIRES SUR LE VER A SOIE TASAR *ANTHRAEA MYLITTA* DRURY

U. S. P. SINHA* , S. DAS, J. PRASAD, S. K. CHAUDHARY & N. SURYANARAYANA

Central Tasar Research & Training Institute, P. O. Piska Nagri, Ranchi - 835 303, Jharkhand
(Inde).

Les études sur l'effet de la fortification des feuilles de Terminalia tomentosa avec différentes concentrations de différents nutriments secondaires sur le ver à soie tasar, Anthraea mylitta Drury révèlent que parmi les dix traitements à l'étude, la fortification des feuilles avec du sulfate de magnésium (2 % p/v) est la plus efficace pour améliorer les caractères commerciaux des cocons d'Anthraea mylitta Drury. Avec ce traitement, le poids larvaire, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon et la richesse soyeuse augmentent respectivement de 33,32 ; 33,33 ; 31,33 et 31,05 % par comparaison au témoin.

INTRODUCTION

Terminalia tomentosa est l'une des plantes hôtes primaires du ver à soie tropical tasar *Anthraea mylitta* Drury (Jolly et coll., 1968). Le ver à soie tire les nutriments nécessaires à sa croissance de la feuille de la plante hôte. La croissance et le développement des vers à soie et les caractères économiques des cocons sont donc très influencés par la teneur en nutriments des feuilles. Plusieurs études ont été réalisées pour améliorer la qualité et la quantité des feuilles des plantes hôtes du tasar par l'application des principaux nutriments et de micronutriments (Sinha et coll., 1999, 2002 et 2006). Shankar et coll., (1994) ont rapporté que le manque de nutriments secondaires a un effet négatif sur la croissance de la larve du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. et sur la qualité de ses cocons. Radha et coll., (1988) ont aussi constaté une diminution de la récolte de cocons et du filament de soie du ver à soie à cause de l'alimentation avec de la feuille de mûrier présentant une carence en soufre. Cependant, aucun travail n'a été rapporté jusqu'à présent sur l'effet de la fortification des feuilles de *T. tomentosa* avec des nutriments secondaires sur le ver à soie tasar *A. mylitta*. Cette étude a été réalisée dans le but d'étudier l'effet de l'apport de compléments en nutriments secondaires pour les feuilles de *T. tomentosa* et pour évaluer son influence sur la croissance de la larve et les caractères commerciaux des cocons d'*A. mylitta*.

MATERIELS ET METHODES

On élève des larves d'*Anthraea mylitta* venant d'éclore, du premier au cinquième âge, à l'intérieur, sur des feuilles de *T. tomentosa* fortifiées avec des concentrations de nutriments secondaires à 1 %, 2 % et 3 %, administrés pendant les premières (juillet - août) et deuxième (sept - octobre) saisons d'élevage, d'après la description de Rana et coll., (1987). Simultanément, on

* Auteur auquel adresser la correspondance.

maintient un témoin (sans nutriments secondaires). On répète les traitements, qui sont constitués de 100 vers de taille uniforme, trois fois.

Traitements :

- T1 = Chlorure de calcium (1 %, p/v)
- T2 = Chlorure de calcium (2 %, p/v)
- T3 = Chlorure de calcium (3 %, p/v)
- T4 = Sulfate de calcium (1 %, / p/v)
- T5 = Sulfate de calcium (2 %, / p/v)
- T6 = Sulfate de calcium (3 %, p/v)
- T7 = Sulfate de magnésium (1 %, p/v)
- T8 = Sulfate de magnésium (2%, p/v)
- T9 = Sulfate de magnésium (3%, p/v)
- T10 - Témoin (sans nutriment secondaire)

On analyse statistiquement les données sur le poids larvaire, le taux effectif d'élevage (ERR) et les caractères du cocon. On suit la méthode suggérée par Arunachalam et Bandyopadhyay (1984) pour décider du classement des traitements commerciaux à l'étude.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les effets de la fortification des feuilles de *T. tomentosa* avec des nutriments secondaires à différentes concentrations sur le ver à soie tassar *Antheraea mylitta* sont présentés dans le Tableau I. Il est évident d'après le Tableau que la fortification des feuilles de *T. tomentosa* avec des nutriments secondaires a un effet favorable, par rapport au témoin, pour tous les caractères, c'est-à-dire le poids larvaire, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon et la richesse soyeuse pendant les deux saisons d'élevage. Ces résultats corroborent les observations de Shankar et coll., (1994) qui ont aussi observé que les nutriments secondaires jouent un rôle important dans la croissance, le développement de la larve, le poids du cocon et la qualité de la soie du ver à soie. Parmi les dix traitements à l'étude, le traitement T8 s'avère le plus efficace pour augmenter le poids larvaire, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon et la richesse soyeuse, suivi par le traitement T4. Avec le traitement T8, en l'occurrence la fortification des feuilles avec du sulfate de magnésium (2 %, p/v), le poids larvaire, l'ERR, le poids du cocon et la richesse soyeuse augmentent respectivement de 33,32 ; 33,33 ; 31,33 et 31,05 % par comparaison au témoin. Bose et coll., (1995) ont rapporté que les teneurs en minéraux stimulent les activités métaboliques chez le ver à soie, ce qui entraîne une amélioration quantitative en matière de cocons et de soie. Gunther (1981) a conclu qu'environ 300 réactions enzymatiques sont influencées par les ions Mg. Quand le Magnésium passe chez les vers à soie, il accélère la croissance des vers à soie par l'orientation de ses activités physiologiques. De plus, on sait que le soufre joue un rôle important dans la synthèse des acides aminés, des protéines et des vitamines. Cela pourrait être la raison de l'amélioration des caractères commerciaux des cocons, lorsqu'on fortifie les feuilles avec du sulfate de magnésium. De plus, Viswanath et Krishnamurthy (1982) ont aussi constaté que les larves de vers à soie alimentées avec des feuilles vaporisées avec du Mg, donnent de meilleurs rendement en cocons et poids du cocon. Les résultats de Loknath et Shivashankar (1985) confirment aussi nos observations. Ils ont observé que quand on alimente les vers à soie du mûrier avec des feuilles fortifiées avec du Magnésium (1,25 kg /ha), cela influence favorablement le rendement en cocons et la richesse soyeuse.

Avec le traitement T2, c'est-à-dire, quand on procède à l'élevage avec des feuilles fortifiées avec du chlorure de calcium (2 %, p/v), le poids larvaire, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon et la richesse soyeuse augmentent respectivement de 24,63 ; 20,00 ; 24,48 et 24,62 % par comparaison au

témoin. Ces observations sont en accord avec les résultats de Subburathinam et Chetty (1991), qui ont rapporté que l'enrichissement des feuilles de mûrier avec du chlorure de calcium (1 %) augmente les caractères du cocon - poids du cocon (11,42 %), poids de la coque (16,75 %) et richesse soyeuse (6,7 %). Par ailleurs, la deuxième saison d'élevage semble être plus favorable que la première saison d'élevage pour tous les caractères pris en considération. Pendant la deuxième saison d'élevage, le poids larvaire, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon et la richesse soyeuse augmentent respectivement de 5,35 ; 11,73 ; 2,78 et 1,59 % par comparaison à la première saison d'élevage.

Les données dans le Tableau II montrent les classements attribués aux dix traitements différents de nutriments secondaires étudiés pour quatre caractères, c'est-à-dire le poids de la larve, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon et la richesse soyeuse, d'après la méthode d'Aranuchalam et Bandyopadhyay (1984), où les valeurs les plus faibles signifient les classements les plus élevés. Il est évident d'après le Tableau que parmi les dix différents traitements étudiés, le traitement T8 (sulfate de magnésium - 2 %, p/v) est le meilleur suivi par T2 (chlorure de calcium - 2 %, p/v).

On en déduit donc que la fortification des feuilles avec du sulfate de magnésium (2 %, p/v) est la plus efficace pour améliorer les caractères commerciaux des cocons d'*Antheraea mylitta* Drury ; elle permet une amélioration du poids de la larve, du taux effectif d'élevage, du poids du cocon et de la richesse soyeuse de respectivement 33,32 ; 33,33 ; 31,33 et 31,05 % par rapport au témoin.

A NOVEL OCCURRENCE OF « TRICOTYLEDONY » IN TROPICAL TASAR SILKWORM HOST PLANT - *TERMINALIA CHEBULA* RETZ.

R. KUMAR, GARGI & N. SURYANARAYANA

Plant Breeding and Genetics Laboratory, Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi – 835 303, India.

Terminalia chebula Retz. (Combretaceae) is one of the important secondary food plants of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. The percentage of seed germination is 51.33. The growth of the tricotyledonous seedling was found normal like that of dicotyledonous seedlings in all aspects.

Keywords: *Antheraea mylitta*, embryogenesis, *Terminalia chebula*, germination, Tricotyledony, supernumerary, primordial.

Terminalia chebula belongs to the family Combretaceae. It is one of the important secondary food plants of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. It grows up to height ranging from 15 to 25 m and 1.5 to 2.5 m in diameter with a cylindrical bole varying from 4 to 9 meters. The distribution of this species is across sub Himalayan tracts from Sutlej (Punjab) eastwards to West Bengal and Assam ascending up to 1500 m in deciduous forest. The leaf buds, branchlets and young leaves have soft, shining and rust coloured hairs. Tree sheds its leaves during February and March and new foliage appears in April. It flowers during April and fruits ripen from October to January. Seeds are the principal source of propagation and give rise to variability depending upon the source of origin and concerning morphological and physiological characters (Mathur *et al.*, 1984 and Vakshya *et al.*, 1992). Germination is the direct indicator of viability i. e. potential to grow into a normal healthy plant. Therefore, evaluation of seedlings is one of the most important aspects of seed testing. The present report deals with the tricotyledony which has been observed during the experiment carried out in order to evaluate the germination and vigour of seeds.

Seeds were collected from Hesadeeh forest in East Singhbhoom district of Jharkhand, India during June 2004. A sample of 300 seeds was taken in order to study the germination. The experiment has been done in 4 replications of 75 seeds each according to the International Seed Testing Association (ISTA) rules. The seeds were sown in plastic trays filled with sterilized river sand and kept in the mist chamber with intermittent misting to keep the sand moist.

Observations on germination were recorded daily. Germination commenced on 25th day after sowing and accomplished within 40 ± 2 days.

Out of 300 seeds, 154 seeds germinated, of which only one seedling has developed into tricotyledons as compared to dicotyledons amid normal seedlings (Fig. 1). The seedlings after 7 days were transferred into polythene bags containing soil: sand: farm yard manure at the ratio of 1:2:1 to observe further growth. The growth of the tricotyledonous seedling was found normal like that of dicotyledonous seedlings in all aspects. The origin of tricotyledonous seedlings during embryogenesis could be the result of differentiation of supernumerary primordial.



Fig. 1. *Terminalia chebula* seedling with three cotyledons.

Fig. 1. Plantule de *Terminalia chebula* avec trois cotylédons.

This observation is corroborated with the results of Nagesh *et al.*, 2000, 2001 and 2007 who have also reported the presence of tricotyledony in *Acacia mellifera*, *Prosopis cineraria* and *Eucalyptus citriodora*. The tricotyledonous seedling plant has been raised along with the dicotyledonous in the field gene bank for further studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial assistance under NATP (PB) from ICAR, New Delhi is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- MATHUR R. S., SHARMA K. K. & RAWAT M. N. S. (1984) Germination behaviour of various provenance of *Acacia nilotica* spp. *Indica*. Indian Forester. 110, 435-449.
- NAGESH K., CH. SUDHAKAR REDDY & BHANJA M. R. (2000) Tricotyledony in *Acacia mellifera* (Vahl.) Benth. (Mimosaceae). Indian J. For. 23, 440-441.
- NAGESH K., GOUD G. K., PRITHVIRAJ M. & RAO P. S. (2001) Tricotyledony in *Prosopis cineraria* (L.) Druce. Mimosaceae. Indian Forester. 127, 591-592.
- NAGESH K., RAMESH M., VINAY KUMAR & BHANJA M. R. (2007) Occurrence of albino and tricotyledonos seedlings in *Eucalyptus citriodora*, Hook., Myrtaceae. Indian Forester 133, 279-281.
- VAKSHYA R. K., RAJORA O. P. & RAWAT M. S. (1992) Seed and seedling traits of *Dalbergia sisso* Rox. Seed source variation studies among ten sources in India. For. Ecol. Mgmt., 48, 265-27.

NOUVELLE OBSERVATION DE «TRICOTYLEDONIE» CHEZ LA PLANTE HÔTE DU VER À SOIE TASAR TROPICAL - *TERMINALIA CHEBULA* RETZ.

R. KUMAR, GARGI & N. SURYANARAYANA

Plant Breeding and Genetics Laboratory, Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi - 835 303, Inde.

Terminalia chebula Retz. (Combretaceae) est l'une des plantes hôtes secondaires importantes du ver à soie tasar tropical, *Antheraea mylitta* D. Le pourcentage de germination des graines est de 51,33 %. On constate que la croissance de la plantule à trois cotylédons est normale dans tous ses aspects, comme celle des plantules dicotylédones.

Terminalia chebula appartient à la famille des Combretaceae. C'est l'une des plantes hôtes secondaires importantes du ver à soie tasar tropical, *Antheraea mylitta* D. Elle pousse jusqu'à une hauteur de 15 à 25m, avec un diamètre de 1,5 à 2,5 m et une cime cylindrique, qui varie de 4 à 9 mètres. Cette espèce est distribuée dans les zones subhimalayennes, de Sutlej (Penjab) à l'est jusqu'à l'ouest du Bengale et en Assam, jusqu'à 1500 m d'altitude dans la forêt à feuilles caduques. Les bourgeons de feuilles, les petites branches et les jeunes feuilles sont douces et brillantes et ont des poils de couleur rouille. L'arbre perd ses feuilles en février et mars et son nouveau feuillage apparaît en avril. Il fleurit en avril et ses fruits mûrissent d'octobre à janvier. Les graines sont la principale source de multiplication et elles donnent naissance à une variabilité qui dépend de l'origine et concerne les caractères morphologiques et physiologiques (Mathur et coll., 1984 et Vakshya et coll., 1992). La germination est l'indicateur direct de la viabilité, c'est-à-dire le potentiel à grandir en plante saine et normale. L'évaluation des plantules est donc l'un des aspects les plus importants pour tester les graines. Ce rapport traite de la tricotylédonie, que l'on a observée pendant l'expérience entreprise pour évaluer la germination et la vigueur des graines.

On recueille les graines de la forêt de Hesadeeh dans la région d'East Singhbhoom dans le Jharkhand, en Inde en juin 2004. On prend un échantillon de 300 graines pour étudier la germination. On réalise l'expérience en 4 répétitions de 75 graines chacune, selon les règles de l'Association Internationale de Test des Graines (ISTA). On sème les graines dans des plateaux en plastique remplis de sable de rivière stérilisé et on les conserve dans une pièce humide en les humidifiant de manière intermittente pour garder le sable humide.

On enregistre les observations sur la germination de manière quotidienne. La germination commence le 25^{ème} jour après les semences et se termine en 40 ± 2 jours.

Sur 300 graines, 154 graines germent, dont une seulement se développe en plantule à trois cotylédons (Fig. 1). On transfère les plantules au bout de 7 jours dans des sacs en polyéthylène contenant du sol : sable : fumier de ferme dans un ratio de 1 : 2 : 1 pour observer la croissance ultérieure. On constate que la croissance de la plantule à trois cotylédons est normale dans tous ses aspects comme celle des plantules à deux cotylédons. L'origine des plantules à trois cotylédons pendant l'embryogenèse pourrait être le résultat de la différenciation du primordium

Cette observation confirme les résultats de Nagesh et coll., 2000, 2001 et 2007, qui ont aussi rapporté la présence de tricotylédons chez *Acacia mellifera*, *Prosopis cineraria* et *Eucalyptus citriodora*. On a cultivé la plantule à trois cotylédons avec les dicotylédones dans la banque génétique pour des études ultérieures.

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** or to **sericologia@inserco.org**. 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** ou à sericologia@inserco.org. 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.

