

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef

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*)

SOMMAIRE – CONTENTS

Revue / Review

- Root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and white) Chitwood in mulberry – a review** 1
- Le nématode de la racine *Meloidogyne incognita* (Kofoid et Blanc) Chitwood chez le mûrier 13
- S. D. PADMA, U. D. BONGALE, J. SUKUMAR, R. S. MALLIKARJUNAPPA & R. N. PUSHPA

Article scientifiques / Scientific papers

- Epidemiological importance of silkworm body surface for persistence of viral contamination by nucleopolyhedrovirus of *Bombyx mori* L. in an artificial rearing environment** 23
- Importance épidémiologique de la surface du corps du ver à soie, pour la persistance de la contamination par le virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* L., dans un élevage sur aliment artificiel 31
- TORU ARAKAWA

- Development of *Nosema bombycis* Naegeli in the ovary, its impact on egg production and disease transmission in silkworm *Bombyx mori* L.** 37
- Développement de *Nosema bombycis* Naegeli dans l'ovaire et impact sur la production d'œufs et sur la transmission de la maladie chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. 47
- N. B. JYOTHI & C. S. PATIL

- Toxicities of secondary metabolites produced by pathogens of *Myrothecium* leaf spot of mulberry diseases (*Myrothecium roridum* and *M. verrucaria*)** 53
- Toxicités des métabolites secondaires produits par des pathogènes de la tache de la feuille *Myrothecium* des maladies du mûrier (*Myrothecium roridum* et *M. verrucaria*) . . 65
- R. MURAKAMI, S. HAYASAKA, S. WADA, K. TATEISHI, T. ARAKAWA, K. MIYAMOTO & W. MITSUHASHI

Rapports techniques / Technical reports

- Application of sodium hypochlorite for controlling virosis and bacteriosis in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.** 71
- Application d'hypochlorite de sodium pour lutter contre les viroses et les bactérioses chez le ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* D. 81
- ALOK SAHAY, N. G. OJHA, V. KULSHRESTHA, G. P. SINGH, D. K. ROY & N. SURYANARAYANA

- Characterization of seven mulberry genotypes for their leaf quality and bioassay with silkworm *Bombyx mori* L.** 85
- Caractérisation de sept génotypes de mûrier par rapport à leur qualité foliaire et évaluation biologique avec le ver à soie *Bombyx mori* L. 95
- JALAJA S. KUMAR & D. M. RAM RAO

Effect of composts enriched with useful / antagonistic microbes on suppression of nursery diseases in mulberry	101
Effet de composts enrichis avec des microbes utiles / antagonistes sur la suppression des maladies de pépinière chez le mûrier	109
D. D. SHARMA, MALA V. R., P. K. DAS & S. B. DANDIN	
Evaluation of some chemicals against <i>Pestalotiopsis disseminata</i> causing grey blight of Som	113
Evaluation de certains produits chimiques contre <i>Pestalotiopsis disseminata</i> responsable de la flétrissure grise chez Som	119
RANJANA DAS, K. DAS & D. K. JHA	

ROOT-KNOT NEMATODE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* (KOFOID AND WHITE) CHITWOOD IN MULBERRY – A REVIEW

S. D. PADMA, U. D. BONGALE, J. SUKUMAR, R. S. MALLIKARJUNAPPA &
R. N. PUSHPA

Karnataka State Sericulture Research & Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore -560062, India.

Root-knot nematode, Meloidogyne incognita (Kofoid and White) Chitwood infesting mulberry has been reported from all the countries practicing sericulture. Nematodes are generally obligate parasites, which feed on living organisms like higher plants, fungi, bacteria, insects and animals. The disease is serious in tropical and sub-tropical countries due to the perennial nature of mulberry and endoparasitic habit of the nematode. This disease reduces 10-12% of leafy yield in addition to affecting the leaf quality thus influencing its feed value to the silkworm Bombyx mori L. The exorbitant cost of pesticides, prolonged residual toxicity period and pollutant nature of these chemicals have forced to accept the ecofriendly methods as effective options for the management of the infestation. An attempt is made to review the work done on the occurrence, distribution, crop losses and control measures of M. incognita infesting mulberry.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* spp. L.), the sole food plant of the silkworm *Bombyx mori* L. is cultivated both in tropical and temperate countries of the world. India with 0.29 million hectares. under mulberry cultivation is the second largest producer of silk in the world. Out of this Karnataka State being the major producer accounts for over 1, 66,000 ha (Anonymous, 1999). Mulberry is affected by a number of diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes. The root-knot nematode, *M. incognita* is found worldwide, but is most serious in tropical and subtropical countries practicing sericulture (Govindaiah & Sharma, 1994). It has a wide range of host plants and causes economic damage to many agricultural crops (Sasser, 1989). Besides causing direct damage, it is also involved in disease complexes with other pathogens and provides entry to pathogenic fungi and breaks the host resistance (Powell, 1971; Webster, 1985). Root knot nematodes are well studied and are found involved in synergistic interactions with other disease causing microbes wherein the crop loss is greater than expected from either of the pathogens alone or as an additive effect of the two together (Franci and Wheeler, 1993).

In mulberry the nematode forms a disease complex with the opportunistic fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. causing stem canker and black root rot leading to the death of plants (Sukumar and Padma, 1999). Properly maintained mulberry garden yields about 35 metric ton of leaf/ha/yr, while the disease reduces about 10-12% leaf production in addition to affecting the leaf quality (Govindaiah, 1990). Apart from causing yield losses, the leaves from diseased plants, being poor in quality, when fed to silkworms are also reported to affect the larval health and reduce the cocoon yield and quality (Gupta, 2001). Manifestation of the disease and its effects are the formation of galls on the roots and stunted growth with reduced branching and vigour

of the plant (Saha *et al.* 1983). An attempt has been made to review the studies carried out on occurrence, crop loss and control measures of *M. incognita* infesting mulberry.

Geographical distribution of *Meloidogyne incognita* infestation on mulberry:

The root-knot nematode (*M. incognita*) affecting mulberry was reported from almost all the countries where sericulture is practiced. Bessey (1911) reported *M. incognita* on mulberry for the first time from USA and subsequently, it was reported from other countries namely Japan (Nozu, 1940), Rhodesia and Nyasaland (Martin, 1958), Israel (Minz, 1956), Australia (Colbran, 1958), India (Narayanan *et al.*, 1966), Brazil (Campos *et al.*, 1974), Iraq (Hussain *et al.*, 1977), USSR (Adylov, 1979) and China (Zhou Sheihiang, 1982).

Hirata (1972) revealed that among eight genera of nematodes associated with mulberry, *Meloidogyne* spp were more frequently found in alluvial soils in Gunma prefecture of Japan. Mulberry fields in Uzbekistan (USSR) were found inhabited by 16 species of pathogenic nematodes, which include species of *Meloidogyne*, *Rotylenchus*, *Pratylenchus*, *Longidorus* and *Aphelenchoides*, further, about 33% of mulberry saplings in nursery were found to be affected by root knot nematode (Adylov, 1979). Toida (1984) while analyzing the distribution of root-knot nematode species in Japan, found that *M. mali* had a wide geographical distribution. *M. hapla* and *M. mali* were adapted to low temperature areas, while *M. incognita* and *M. javanica* were confined to warm climate. Qin *et al.* (1985) reported that 40% of the mulberry plantations investigated were diseased in Zhejiang (China). Nematodes (*Meloidogyne* spp.) were distributed at soil depth of 5-15 cm and nematode populations were highest in May and September. Govindaiah (1990) conducted a survey in three districts of Karnataka (India) and found 58, 62 and 13% of disease incidence in Bangalore, Mandya and Mysore districts respectively. Maximum incidence and intensity of the disease was found in sandy soils under irrigated condition, while it was not found under rain fed condition. Sharma and Sarkar (1997) conducted a survey in 11 major localities of Mysore district (Karnataka, India) wherein they reported that the disease incidence was very high in red sandy soil (66%) with severe to very severe intensity having 31 to more than 100 galls and egg masses per root system. Very low incidence was recorded in black cotton soil (6%) with mild intensity having less than 10 galls and egg masses. Among different farming systems, a high incidence was found in irrigated fields (48%). *M. incognita* and its race-2 were widely distributed in the Mysore region. Philip *et al.* (1997) also observed root-knot incidence on mulberry in Malavalli Taluk of Karnataka (India). A survey conducted by the Karnataka State Sericulture Research and Development Institute (KSSRDI), Bangalore (India) indicated that the nematode is widespread, occurs in over 70- 80% of the mulberry fields in the intensive sericulture areas of the Karnataka State (India). The disease occurs in over 70% of mulberry fields resulting in leaf yield and quality reduction of up to 18-22% (Sukumar and Padma, 1999; Sukumar and Govindaiah, 2001). Though the root knot nematode disease is ubiquitous in West Bengal, the disease occurred more often in mulberry fields of Malda (sometimes 85% of the total fields were affected) than in other places (Das *et al.*, 1990). This localized population pattern of nematodes favours the existence of a close tie between some edaphic factors favourable for growth of nematodes.

Manifestation and biology:

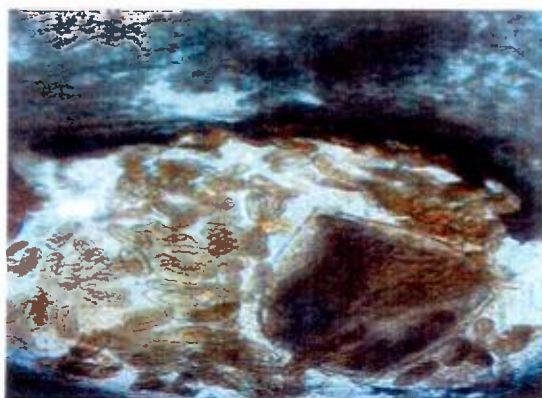
As mulberry leaf is the basic raw material in sericulture, the importance of its quality needs no emphasis. Feeding the diseased leaves to silkworms affects their growth and cocoon quality. Though the root-knot disease in mulberry was reported as early as 1966 from India, emphasis was given since 1980 onwards only, and since then several reports are available in addition to several papers published from different parts of the world. Nematodes belong to the Class Nematodes and are ubiquitous in nature, and mostly are present in the soil. Almost all nematodes feed on living organisms like higher plants, fungi, bacteria, insects and animals. Plant parasitic nematodes are generally obligate parasites. These are transparent or have surface annulations; minute, elongated or eel shaped and move with snake like motion. They possess a stylet with which they puncture intact plant cells and inject their

secretions. Cell contents, partially dissolved by the saliva are ingested. Adults morphologically though similar are very different, sexes are usually separate. In *Meloidogyne* sp. the females are swollen, saccate and sedentary, with the posterior end protruding out on the root surface where eggs are accumulated in an egg mass induced hyperplasia and hypertrophy of host cells appear. Males are vermiform.

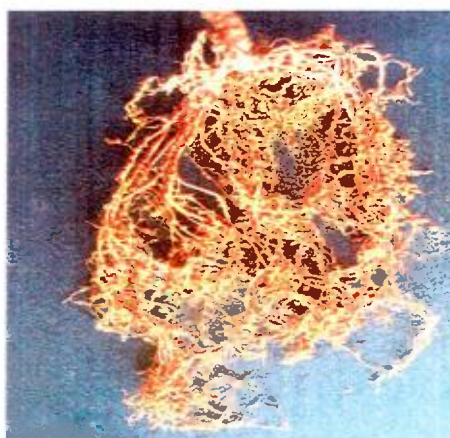
Life Cycle:

It consists of egg, four juvenile stages (J1, J2, J3 & J4) and adult. A few species reproduce by amphimixis, most *Meloidogyne* species reproduce primarily by parthenogenesis. One-two months are needed for completion of the life cycle. J2 infect the host plants (Biligrani and Dube, 1976).

FEMALE WITH EGG MASS



NEMATODE INFESTED ROOTS



Pathogenicity and yield loss:

Several reports are available with regard to the stunted growth in several agricultural crops with increasing inoculum density. Narayan *et al.* (1966) observed chlorosis of leaves, stunted plant growth and reduced leaf size in mulberry plants severely affected with *M. incognita*. Similarly, stunted growth of mulberry and reduction in number of leaves were reported by Nozu (1940) in Japan and Campos *et al.* (1974) in Brazil. Saha *et al.* (1983) reported diminished shoot growth and leaf yield due to *M. incognita*. Sukumar *et al.*, (2005) arrived at the conclusion that root-knot disease caused by *M. incognita* is one of the major diseases of mulberry reducing both yield (22-28%) and quality of mulberry leaves.

According to Das *et al.* (1990) owing to high root-knot nematode infestation, severe enough to cause root galls, marginal necrosis, gradual withering of foliage, chlorosis, stunted growth of mulberry plants, a considerable loss in the production of mulberry leaves and deterioration of the quality occur, which adversely affect the yield and quality of cocoons. Analysis of damage caused by *M. mali* studied by Toida (1991) indicated that the growth of seedlings and graftings of mulberry inoculated with more than 2500 *M. mali* was significantly inferior to that of untreated mulberry trees. One year after the inoculation, 30-60% trees infected by nematodes were dead. In 2-3 year old mulberry trees inoculated with nematodes, leaf weight was reduced by 10-20%, and symptoms caused by the nematode infection came out slowly and damage was less in comparison with younger mulberry trees. Seinhorst (1965) reported that maximum damage to the plant occurs when the nematode population exceeds certain limits. According to Hanounik *et al.* (1975), the magnitude of crop loss depends upon factors such as the population density of the J2 present, crop susceptibility and environmental conditions. Govindaiah *et al.* (1991) tested the effect of different inoculum levels of *M. incognita* (0, 10, 100, 1000 and 10,000 J2 /plant) on plant growth and nematode development. They reported that as the inoculum level increased, there was a corresponding decrease in plant growth and leaf yield ranging from 8.1 to 37.4% and 5.2 to 29.8% respectively under different levels of inoculum. The avoidable leaf yield loss due to *M. incognita* under field condition was 10-12%. Paul *et al.* (1995) reported that inoculation of *M. incognita* in pots where mulberry plants were grown led to a significant reduction in plant growth, leaf yield and leaf protein content. Silkworm larvae fed on the leaves of nematode infected plants suffered a significant reduction in their silk layer ratio and silk gland / body weight ratio.

Management of root knot nematode:

In soil ecosystem plants are constantly exposed to multiplicity of organisms, many of which are common components of the soil biosphere. As they occupy the same environmental niche, such organism besides influencing the plants, are likely to influence each other. According to Fawcett (1931) "*Nature does not work with pure cultures*" and associated organisms, result in disease syndrome of complex nature affecting several plants. In-depth analysis and realization about the startling features of microbial ecology have led to the replacement of the term "control" with "management", and since no single method of pest control has given a lasting solution, there is hardly any comprehensive effort to highlight the significance of multipathogenic scenario vis-à-vis their integrated management (Khan and Parvatha Reddy, 1993). Further mulberry being a perennial crop, it is difficult to control the disease by a single method. Hence, various methods are adopted for the management of mulberry diseases. The available management methods are grouped here for convenience into cultural, chemical, biological, and host resistance, and are summarized accordingly.

1. Cultural method:

Application of deoiled cakes, organic manures and mulching of medicinal plants have been receiving considerable attention in recent years for the cultural control of the disease owing to the prohibitive cost of pesticides and their toxicity to human beings and soil flora. Organic amendments provide a long-term solution for disease and soil problems, and hence, they are advocated to be practiced for sustainable leaf production in mulberry cultivation. The oil cakes such as neem,

pongamia, castor, groundnut, etc. are employed as they have no residual effect on the plant and also improve plant growth. They release considerable amounts of phenolics compounds, which are known to be nematocidal (Khan *et al.*, 1974; Alam *et al.*, 1978; Sitaramaiah, 1987). Govindaiah *et al.* (1994) have reported significant improvement in the leaf yield (7.8-22.7%) and significant reduction in number of galls (70-85%) and 55-70% reduction in egg mass production with the application of 3 t/ha application of neem cake. Non-edible oil cakes namely, neem, castor, peanut and gingelly at 1 t/ha is found effective against *M. incognita* in mulberry which in turn reduced the number of nematode galls and also improved the plant growth and leaf yield (Sikdar *et al.* 1986). Sharma *et al.* (1998) studied the impact of neem cake at 2 t/ha/yr and Carbofuran at 40 kg/ha/yr in 4 split doses on the control of *M. incognita* in farmers fields and found the reduction in disease severity by 66.7-73% and 75.1% -76.1% by the application of neem cake and carbofuran respectively and increase in leaf yield of 18.8 and 16.9 % was observed. The leaf yield loss was estimated to be 12.6-13.7%.

Available control measures:

Group	Recommendation	References
1. Chemical	i) DD, EDB, DBCP ii) Organic phosphates & Carbamates iii) Aldicarb iv) Carbofuran v) Thimet 10 G, Furadan 3G vi) Sebufos 10G	Ichinohe (1965) Hussaini (1986), Meher & Sethi (1988), Heald (1987) Sikdar <i>et al.</i> (1986) Govindaiah <i>et al.</i> (1993) Sarkar <i>et al.</i> (1992) Sharma & Govindaiah (1995)
2. Cultural		
a) Organic amendments	i) Oil cakes of neem, pongamia, castor, groundnut etc. ii) Oil cakes of neem, castor, peanut and gingelly iii) Neem cake iv) FYM + neem cake + marigold v) Leaf extracts of <i>Carica papaya</i> , <i>Euphorbia synadenium</i> , <i>Calotropis gigantea</i> and <i>Sesamum indicum</i> vi) Extracts of leaves and stems of Mexican marigold (<i>Tagetes minuta</i>)	Khan <i>et al.</i> (1974), Alam <i>et al.</i> (1978), Sitaramaiah (1987) Sikdar <i>et al.</i> (1986) Govindaiah <i>et al.</i> (1994) Sukumar <i>et al.</i> (2005) Philip <i>et al.</i> (1993) Toida (1972)
b) Mulching	i) Green leaves of marigold, neem, pongamia, sun hemp and water hyacinth ii) Green leaves of pongamia	Singh and Sitaramaiah (1967, 1971), Kaliram and Gupta (1982), Sharma <i>et al.</i> (1985), Nandal and Bhatti (1986) Govindaiah <i>et al.</i> (1989)
c) Inter-cropping	i) Nematicidal plants like marigold, sunhemp, sesame, mustard, etc. ii) Mexican marigold (<i>Tagetes minuta</i>)	Davide (1979), Bakker <i>et al.</i> (1979). Toida (1972), Govindaiah <i>et al.</i> (1991)

Group	Recommendation	References
3. Biological	i) Vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) (<i>Glomus fasciculatum</i>)	Chandrashekar <i>et al.</i> (1997)
	ii) Nematophagous fungus <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Verticillium chlamydosporium</i> and VAM	Sharma <i>et al.</i> (2001)
	iii) <i>Trichoderma harzianum</i> – THN 1	Sukumar <i>et al.</i> (2004, 2005)
4. Host resistance	Calebressa	Campos <i>et al.</i> (1974)
	Assam bola, S-30, ACC-115, S-1, MR-2, RFS-135, Bilidevalaya, Almora Local and Punjab Local	Govindaiah (1990)
	S-1, S-3, S-14, S-30, S-34, S-54, MR-2, RFS-135	Govindaiah <i>et al.</i> (1997)

Mulching of green leaves of marigold, neem, pongamia, sunhemp and water hyacinth proved effective in the control of nematodes and also increased the organic matter and favoured antagonistic microbes in soil (Singh and Sitaramaiah, 1967, 1971; Kaliram and Gupta, 1982; Sharma *et al.*, 1985; Nadal and Bhatti, 1986). Govindaiah *et al.* (1989) observed that mulching leaves of neem and pongamia controlled root-knot nematode in mulberry. Mulching of pongamia leaves was found to be superior over neem leaves in improving the plant growth and leaf yield. Leaves of all these plants can be used as green mulch in mulberry gardens to reduce the incidence of root-knot disease (Philip *et al.*, 1993).

Intercropping of nematicidal plants like marigold, sunhemp, sesame, mustard, etc. was found to be highly effective against *Meloidogyne* spp. (Davide, 1979; Bakker *et al.*, 1979). In marigold, Alpha terthienyl, an inhibitory chemical is responsible for the control of root-knot disease (Uhlenbrock and Bijiloo, 1958; Munoz *et al.*, 1982). Govindaiah *et al.* (1991) reported higher densities of marigold (*Tagetes patula*) in between mulberry rows against *M. incognita* and mulching in soil after the full growth reduces disease infestation and improvement in leaf yield.

The usage of plant products is another alternative for management of nematodes. Toida (1972) reported the inhibition in hatching of nematode eggs by extracts of leaves and stems of Mexican marigold (*T. minuta*) which could destroy all *Meloidogyne* species (J2 larvae and free living nematodes) within 48 hr. Leaf extracts of *C. papaya*, *E. synadenium*, *C. gigantea* and *S. indicum* at S 10 concentration completely suppressed the larval hatching of *M. incognita* in petridishes, while *C. papaya* and *E. synadenium* leaf extracts at 48 hr. exposure gave 100 and 96% mortality, respectively. Sukumar *et al.* (2005) also reported that the root knot intensity could significantly be controlled through soil amendments with increased dose of farmyard manure (40 t/ha) or by integrating farmyard manure + neem cake + marigold with comparable results obtained through chemical treatment with carbofuran. The organic amendments not only reduce the disease incidence and intensity but they also help in soil build up, improvement in soil fertility, productivity and soil health.

2. Chemical control:

Effective management of various nematodes on crop plants has been achieved with chemicals and accordingly nematicides have proved to be the reliable means of controlling wide variety of nematodes. Ichinohe (1965) reviewed the literature on the usage of various fumigants in mulberry for

control of root-knot disease in Japan. He found that DD and EDB were generally used as pre-planting treatment and DBCP as post-planting application. DBCP is commonly used in established fields of mulberry. Organic phosphates and carbamates have been found to be effective for control of root-knot nematodes (Hussaini, 1986; Meher and Sethi, 1988). They also have the advantage of relatively low phytotoxicity (Heald, 1987).

Among the different nematicides available, the fumigants like DD (1,2 Dichloropropane -1,3 Dichloropropene), EDB (Ethylene Di Bromide) and DBCP (Di Bromo Chloro Propane) are found to be more effective as compared to granular nematicides. Fumigants though effective, are not economical and mostly used in nursery stages

Reports are available on the nematicidal chemicals and plant-based products tested in different parts of India. Aldicarb at 30 kg/ha/yr significantly reduced the number of nematode galls of *M. incognita* and was found to be effective to plant growth and leaf yield of mulberry (Sikdar *et al.* 1986). A field experiment conducted by Sarkar *et al.* (1992) revealed that neem oil-cake (1500 kg active ingredient (a.i) /ha/yr), Thimet 10G (3 kg a.i/ha/yr) and Furadan 3G (6 kg/a.i/ha/yr) applied four times a year reduced the nematode infestation and increased the leaf yield of mulberry. Application of Carbofuran at different doses *viz.*, 2, 4 & 6kg a.i/ha significantly reduced the disease and improved the leaf yield of mulberry to an extent of 8.5 to 27.0 at different doses over control (Govindaiah *et al.*, 1993). In the same study the percentage reduction in nematode galls and egg mass production was 76.0 to 86.5 and 70.0 to 75.0 respectively in different doses. Under pot culture studies, Sebufos 10G was found very effective against *M. incognita*, even at a low dosage of 1 kg a.i/ha. Durofume (ethylene dibromide + methyl bromide) was effective on mulberry as a preplanting treatment against *M. incognita* and weeds with significant reduction in the nematode galls (86.0-96.1%) and egg mass (87.9-97.6%) in fumigated plots over the control. Plant height, leaf moisture and leaf yield also increased significantly (Govindaiah *et al.*, 1993). Significant reduction in hatching of *M. incognita* J2 with increase in concentration of Sebufos 10G with maximum suppression of hatching recorded in 1,000 ppm (99.62%) and minimum in 100 ppm (69.70%) solutions (Sharma and Govindaiah, 1995). Govindaiah *et al.* (1997) also reported that, among the different treatments used against *M. incognita* infesting mulberry, Sebufos (cadusafos) (1-3kg a.i/ha) was found to be the most effective. It increased the leaf yield by 10-14% and reduced root galls and egg mass production by 80-90%.

3. Biological Control:

Prohibitive costs of chemical and their adverse ecological impacts are major compulsions for diversions of research priorities from chemical methods to other alternatives among which the use of bioagents will go a long way in nematode management (Nagarajan, 1990). The successive shifting of priorities from chemical to cultural methods have led to integrated management concepts with adequate emphasis on the biological interventions such as parasites, predators, fungi, bacteria, viruses, and safe to non-target species, beneficial insects, higher animals and man with least effects on environment and ecosystem (Jayaraj, 1991). Sterling (1991) defined the term "biological control of nematodes" in classical sense as "reduction of nematode populations which accomplished through the action of living organisms other than nematode resistant host plants, which occur naturally or through the manipulation of the environment".

High residual toxicity to silkworms, prohibitive cost and adverse impact on soil microorganisms hinders wider adoption of Carbofuran for controlling the root-knot nematode, and sub lethal doses of carbofuran are also known to induce resistance to *M. incognita* (Yamashita and Viglierchio, 1987). Generally five to seven cocoon crops are obtained in a year, and with the use of Carbofuran one or two rearings may be missed due to the residual toxicity of the chemical. Hence, biocontrol of the root-knot nematode is the most promising proposition and is more beneficial in view of silkworm and soil health.

Chandrashekar *et al.*, 1997 have reported that vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungal inoculation in mulberry reduced the root-knot nematode, galling and nematode multiplication to a considerable extent of as high as 63.0% in *Acaulospora laevis* and 54.2% in *Glomus fasciculatum*. The presence of the nematode did not affect the VAM colonization in the mulberry. Padma and Sukumar (2004), could reduce the incidence of root knot nematode, by employing the nematophagous fungi *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium chlamydosporium* and Vesicular arbuscular mycorrhiza. Bioneema (*Verticillium chlamydosporium*) along with neem oil cake, which showed significantly less disease incidence and maximum leaf yield (Sharma *et al.*, 2001).

T. harzianum-THN1 parasitizing the egg masses of root knot nematode *M. incognita* was isolated from galled mulberry roots and its potential for controlling root knot disease was evaluated (Sukumar *et al.*, 2004). The results revealed that the fungus was equally effective in controlling the disease in nematode infested mulberry fields under field conditions which was significant over the most commonly used egg parasitic fungus *P. lilacinus*. The disease reduction recorded with *T. harzianum* was on par with the plants treated with the nematicide carbofuran. The results also suggest that *T. harzianum* – THN1 could be used as a potent ecofriendly biocontrol agent against *M. incognita* in mulberry without any residual toxicity to silkworms.

According to Sukumar *et al.* (2005) root-knot disease management through soil organic amendments is the most effective and cost effective method. The nematode control effect can further be improved if the amendments are enriched with the biocontrol agent 'Seri-Nematoguard'. The fungus *Trichoderma harzianum*-THN1 in Seri-Nematoguard (2 kg/acre in 2 split doses/year) being self-perpetuating, economical and free from residual effects can become an effective component of integrated disease management package and provide a long-term control of the disease in an eco-friendly manner.

4. Integrated method:

Sukumar *et al.* (2002) have reported the following integrated method for the control of root knot nematode in mulberry:

- ⇒ Use of nematode free saplings for planting.
- ⇒ Application of sufficient quantities of farmyard manure at 40 tons / hectare in two split doses.
- ⇒ Application of *T. viridae* or *T. harzianum* or *P. lilacinus* at 2 kg /acre in two split doses.
- ⇒ In severe cases application of 800g/acre of Carbofuran is advocated.

5. Host resistance:

The effective and safe way of controlling plant parasitic nematodes is to evolve nematode resistant cultivars. The work done on host resistance in mulberry is scanty. Campos *et al.* (1974) have screened a few varieties of mulberry against *Meloidogyne* spp., and found that mulberry variety Calabresa was fairly resistant. Govindaiah (1990) screened 55 varieties of mulberry comprising indigenous, exotic and hybrids against *M. incognita*. Among 36 indigenous varieties screened, nine namely Assam bola, S30, ACC115, S1, MR2, RFS135, Bilidevalaya, Almora Local and Punjab Local were resistant to nematodes with less gall and egg mass index. Out of 11 exotic varieties, Shrim5 showed some resistant reaction and among eight hybrids, AB × Philippines and K2 × Kokusu were found to be resistant. Varieties like S30, MR2 and RFS135 have shown resistant reaction in addition to being high yielders, which can be used in breeding programmes and also for field cultivation since, they are released as improved varieties. Varieties like S1, S30, MR2, and RFS135 are reported to produce 30-35 tonnes leaf production/ha/year at par with present popular varieties. These can be used for cultivation in root-knot disease prone areas and in breeding programmes for future improvement as donor parent. The popular varieties like S14, S54, S34 and S3, which are cultivated by farmers, were found moderately resistant (Govindaiah *et al.*, 1997).

Future line of investigations:

- a. Detailed studies on the influence of various ecological factors on distribution and incidence of the disease.
- b. Molecular characterization of translocatable metabolites in nematode and determination of their biochemical nature of mode of action, specificity and to understand the genetic basis of mechanism of infestation, physiological and histological changes in the disease.
- c. Detailed studies with respect to population variation of nematode in relation to different agro-climatic conditions and evaluation of the influence of different soil types.
- d. Studies on integration of several other methods of management under field conditions and testing the models for integrated management of the disease complexes (Root-knot + Root rot complex) at different agro-climatic conditions and at specific situations.

Root knot nematode in mulberry is becoming severe in recent years. A multidisciplinary approach for integrated crop management for the control of the disease helps in protecting the environment from pollution and residual toxicity caused on flora and fauna as also on the host plant. The KSSRDI has brought out integrated control of root knot in mulberry through organic amendments and chemical methods (Padma *et al.*, 2004). Research work on this aspect has to be geared up to isolate the resistant gene, which can be exploited to produce resistant variety in mulberry. Although scattered reports are available on the occurrence, distribution, crop losses and control of root-knot nematode *M. incognita* causing root knot in mulberry, much emphasis has to be given for the cultural, biological and molecular methods of disease management.

ACKNOWLEDGEMENT

The present review paper was prepared in connection with an on going inter-institutional network project on '**Identification of DNA markers for pest and disease resistance in mulberry**' funded by Department of Bio-Technology, Government of India, New Delhi.

REFERENCES

- ADYLOV F.K. (1979) Nematode pests of mulberry. Shelk Tashkent No.1, 10-11 (Ru), Central Asian Res. Inst. Sericulture, Tashkent, USSR. From Rafe rativnyl Zhurnal. Fitopatologica, 6: 79-176.
- ALAM M.M., KHAN A.M., SAXENA S.K. (1978) Mechanism of control of plant parasitic nematodes as a result of the application of organic amendments to the soil V. Role of phenolic compounds. Indian J. Nematol., 8: 136-142.
- ANONYMOUS (1999) Mulberry sericulture in Karnataka. Compendium of Statistics of silk industry, Central Silk Board. 131 pages.
- BAKKER J., GOMMERS F.J., NIEUWENHUIS I., WYNBERG H. (1979) Photo activation of the nematicidal compound a terthienyl from roots of marigold (*Tagetes* spp.). A possible single oxygen molecule. J. Biol. Chem., 254: 1841-1844.
- BESSEY E.A. (1911) Root-knot and its control. U.S. Dep. Agric. Bur. Pl. Ind. Bull., 217: 89.
- BILGRAMI K.S. AND DUBE H.C. (1976) A text book of Modern Plant Pathology. Vikas Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, Pp.344.
- CAMPOS A.R., LORDELLO L.G.E., ABREU O.C., OLIVIRA D.A. (1974) Incidence of *Meloidogyne* on mulberry varieties. In: *Trabalhos apresentados de curso de nematologia*. L.G.B. Dordello (Ed.), Piracicaba, Brazil.
- CHANDRASHEKAR, D.S., SHEKAR SHETTY, H., DATTA, R.K. (1997) Effect of VAM fungi, *Glomus fasciculatum* and *Acaulospora laevis*, against the root-knot nematode of mulberry. Sericologia, 37: 105-108.
- COLBRAN, R.D. (1958) Studies of plant and soil nematodes II. Queens land host records of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Queensl. J. Agric. Sci., 15: 101-136.

- DAS B.K., SARKAR, J., SARKAR, S., DAS, N.K., INDIRAJIT RAY, SEN, S.K (1990) Correlation between some edaphic factors and *Meloidogyne incognita* infestation of mulberry in Malda, West Bengal, Indian J. Nematol., 20: 91-94.
- DAVIDE, R.G. (1979) Effects of nematicides and *Tagetes erecta* on the control of *Meloidogyne incognita* and on yield of tomato. Phillip. Phytopathol., 15: 141-144.
- FAWCETT, H.S. (1931) The importance of investigation on the effects of known mixtures of organisms. Phytopathology, 21: 545-550.
- FRANCL, L.J., WHEELER, T.A. (1993) Interaction of plant parasitic nematodes with wilt inducing fungi.. In: *Nematode interactions*, (Ed Khan M.W., Chapman and Hall), pp 79-103, London.
- GOVINDAIAH, (1990) Studies on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infesting mulberry. Ph.D. thesis, University of Mysore, India.
- GOVINDAIAH, SHARMA, D.D. (1994) Root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting mulberry - a review. Indian Journal of Sericulture, 33: 110-113.
- GOVINDAIAH, DANDIN, S.B., SHARMA, D.D. (1991) Pathogenicity and avoidable leaf yield loss due to *Meloidogyne incognita* in mulberry (*Morus alba* L.). Indian J. Nematol., 21: 52-57.
- GOVINDAIAH, SHARMA, D.D., DATTA, R.K. (1993) Effect of dufume against root-knot nematode and weeds in mulberry garden. Indian Journal of Nematology, 23: 53-56.
- GOVINDAIAH, DANDIN, S.B., GIRIDHAR, K., DATTA, R.K. (1994) Efficacy of different doses of neem cake on *Meloidogyne incognita* infecting mulberry. Sericologia, 34: 717-721.
- GOVINDAIAH, SHARMA, D. D., GUNASEKHAR, V., DATTA, R.K. (1997) Screening of mulberry genotypes against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Indian Journal of Nematology 26: 108-111.
- GOVINDAIAH., SHARMA, D.D., HIMANTHARAJ, M.T., BAJPAI, A.K. (1997) Nematicidal efficacy of organic manures, intercrops, mulches and nematicide against root-knot nematode in mulberry. Indian Journal of Nematology 27: 28-35.
- GOVINDAIAH, SURYANARAYANA, N., SHARMA, D.D., GARGI (1989) Effect of mulching of green leaves for the control of root-knot nematode in mulberry. Indian Journal of Nematology 19: 25-28.
- GUPTA V.P. (2001) Diseases of mulberry and their management; In: *Plant Pathology*. Trivedi. P.C. (ed.), pp. 130-164, Pointer Publishers, Jaipur, India.
- HANOUNIK, S. B., OSBORNE, W. W., PIERECE, W. R. (1975) Relationship between the population density of *M. incognita* and growth of tobacco. Indian J. Nematol., 5: 352-356.
- HEALD, C.M. (1987) Classical nematode management practices. In: *Vistas on nematology: A Commemoration of the twenty-fifth anniversary of Society of Nematologists*. J.A. Veech and D.W. Dickson (Eds.), Maryland, USA, pp.100-104.
- HIRATA, A. (1972) Plant parasitic nematodes associated with mulberry plants in Gunma prefecture. Jpn. J. Nematol., 2: 20-22.
- HUSSAIN, S.I., JAWAID, A., ZAVARI, A.L. (1977) New host records of root-knot and shoot-gall nematodes from Iraq. Plant Dis. Rep., 61: 994.
- HUSSAINI, S.S. (1986) Nematode disease problems in tobacco. In: *Plant parasitic nematodes of India: Problems and progress*. Gopal Swarup and D.R. Dasgupta (Eds.), IARI, New Delhi, pp.371-383.
- ICHINOHE, M. (1965) Nematodes menace in perennial field crops. Biokemia, 9: 10-13.
- AYARAJ, S. (1991) Integrated pest management. In: *Pest Management and Pesticides, Indian scenario*, (Ed., B. Vasanthajar David), pp.7-16, Namrutha Publ., Madras, 384 pp.
- KALIRAM, GUPTA, D.C. (1982) Efficacy of plant leaves, nematicides and fertilizers, alone and in combination against *Meloidogyne javanica* infecting chickpea (*Cicer arietinum* L.). Indian J. Nematol., 12: 221-225.
- KHAN, R.M., PARVATHA REDDY, P. (1993) Management of disease complex. In: *Nematode Interactions*. (Ed., M.W. Khan) pp 345-365, Chapman and Hall, London.
- KHAN, M.W., KHAN, A.M., SAXENA, S.K. (1974) Rhizosphere fungi and nematodes of egg plant as influenced by oil-cakes amendments. Indian J. Nematol., 4: 480-484.

- MARTIN, G. (1958) Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in the federation of Rhodesia and Nyasa land. *Nematologica*, 3: 332-349.
- MEHER, H.C., SETHI, C.L., 1988, Effect of phenamiphos on hatching and invasion of *Meloidogyne incognita* in cowpea. *Indian J. Nematol.*, 18: 186-191.
- MINZ, G. (1956) The root-knot nematode, *Meloidogyne* spp. In: Israel. Plant Dis. Rep., 40: 798-801.
- MUNOZ, L., CASTROC, O., LOPEZE, R., ARIAS, A.R., PIGNANI, F., CALRYADA, J. (1982) Potential nematicides from new natural sources: *Tagetes*. *Gaineriay ciencia* Quinsa, 6: 58-60.
- NAGARAJAN, S. (1990) Pest management integrated approach vital. In: *The Hindu Survey of Indian Agriculture*. 155-161 pp.
- NANDAL, S.N., BHATTI, D.S. (1986) The effect of certain edaphic factors on the nematicidal activity of plant extracts. *Nematologia mediterranea*, 14: 295-298.
- NARAYANAN, E.S., KASIVISWANATHAN, K., IYENGAR, M.N.S. (1966) A note on the occurrence of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) in local mulberry. *Indian J. Seric.*, 5: 33-34.
- NOZU, Y. (1940) Experiments relating to the prevention of the protection from nematodes. *Shimane senshi Tokuho*, p.95.
- PADMA, S.D., SUKUMAR, J. (2004) Mulberry Diseases – Biocontrol potentialities. *Indian Silk*, March 2004, pp 7-9.
- PADMA, S. D., SUKUMAR, J. PRASAD. K.V AND NAGENDRA KUMAR T. D. (2004) ICTP- Integrated control of stem canker, root rot and root knot diseases of mulberry. KSSRDI Technical publication No.59.p12.
- PAUL, A., SINHA, S.P., SUKUL, N.C. (1995) Effect of nematode infected mulberry plants on the growth and silk production of *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 34: 18-21.
- PHILIP, T., GOVINDAIAH, BAJPAI, A.K., DATTA, R.K. (1993) Effect of certain leaf extracts on hatching and mortality of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, infesting mulberry. *Indian Journal of Seric.*, 32: 37-41.
- PHILIP, T., GOVINDAIAH, BAJPAI, A.K., NAGABHUSHANAM, G. NAIDU, N.R. (1997) A preliminary survey on mulberry diseases in South India. *Indian Journal of Sericulture*, 36: 128-132.
- POWELL, N.T. (1971) Interaction between nematodes and fungi in disease complexes. *Ann.. Rev. Phytopathology.*, 9: 253-274.
- QIN, J., ZHO, S.L., DAI, H.F. (1985) Preliminary studies on the occurrence, injury and nematicidal control of mulberry root-knot nematodes in Zhejiang. *Silkworm Science*, 11: 13-17.
- SAHA, S.S., SINHABABU, S.P., SUKUL, M.C. (1983) The effect of nematode infestation on mulberry plants and their effect on feeding silkworm (*Bombyx mori* L.). *Nematologica*, 29: 463-462.
- SARKAR, J., SARKAR, S., DAS, B. K., DAS, N.K., MISTRI, P.K., SAHAKUNDU, A.K., SENGUPTA, K. (1992) Control of nematode infestation in mulberry fields, *Sericologia*, 32: 517-519.
- SASSER, J.N. (1989) Economic importance of plant parasitic nematodes. In: *The farmers' hidden enemy*. North Carolina State University, Raleigh, USA.
- SEINHORST, J.W. (1965) The relation between nematode density and manurial value of some of oil-cake. *Indian J. Tropical Plant Disease*, 3: 51-55.
- SHARMA, D.D., GOVINDAIAH (1995) Effect of Sebufos 10G against *Meloidogyne incognita* in mulberry. *Indian J. Seric.*, 34: 6-9.
- SHARMA, D.D., SARKAR, A. (1997) Incidence and intensity of species/races of root knot nematode associated with mulberry under different farming systems and soil types in Mysore region, Karnataka state, India. *Indian Journal of Sericulture*, 37: 137-141.
- SHARMA, H.L., VIMAL, O.P., PRASAD, D. (1985) Nematicidal and manurial value of some oil-cake. *Indian J. Tropical Plant Disease*, 3: 51-55.
- SHARMA, D.D., CHANDRASHEKAR, D.S., SRIKANTASWAMY, K., GOVINDAIAH (1998) On-farm evaluation of cultural and chemical methods for the control of root-knot nematode disease of mulberry. *Indian Journal of Sericulture*, 37: 61-63.

- SHARMA, D.D., CHANDRASHEKAR, D.S., GUNASEKHAR, V., REKHA, M., SARKAR, A. (2001) Comparative efficacy of different control measures against root knot nematode disease of mulberry. *Indian Journal of Sericulture*, 40: 151-157.
- SIKDAR, A.K., GOVINDAIAH, MADHAV RAO, Y.R., JOLLY, M.S., GIRIDHAR, K. (1986) Control of root-knot nematode disease (*Meloidogyne incognita*) in mulberry by aldicarb and oilcakes. *Indian J. Seric.*, 25: 33-35.
- SINGH, R.S., SITARAMAIAH, K. (1967) Effect of decomposing green leaves, sawdust and urea on the incidence of root-knot of okra and tomato. *Indian Phytopathol.*, 20: 349-355.
- SINGH, R.S., SITARAMAIAH, K. (1971) Control of root knot through organic and inorganic amendments of soil: Effect of oil cakes and sawdust. *Indian J. Mycol. Plant. Pathol.*, 1:20-29.
- SITARAMAIAH, K. (1987) Cultural control of plant parasitic nematodes. In: *Problems and progress in economic phytonematology*. D.S. Bhatti and R.K. Walis (Eds.), Haryana Agricultural University, Hissar, India, p. 262.
- STERLING, G.R. (1991) *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes*. CAB International, UK, 282 PP.
- SUKUMAR, J., GOVINDAIAH (2001) Mulberry diseases and control measures. In: *Handbook of Sericulture Technologies*. Dandin, S.B., J. Jayaswal and K. Giridhar (eds.), pp 76-87, Central Silk Board, Bangalore.
- SUKUMAR, J., PADMA, S.D. (1999) Diseases of mulberry in India. Research progress and priorities; In: *Advances in mulberry sericulture*. Devaiah, M.C., K.C. Narayana Swamy and V.G. Maribashetty (eds.), pp. 154-186, G. V. K. Publications, Bangalore, India.
- SUKUMAR, J., PADMA, S.D., BONGALE, U.D. (2002) Integrated management of root knot nematode, root rot and stem canker in mulberry. KSSRDI Technical Publication No.42 pp 26.
- SUKUMAR, J., PADMA, S.D., BONGALE, U.D. (2004) Biological control of mulberry root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Indust. Entomol.*, 8: 175-179.
- SUKUMAR, J., PADMA, S.D., BONGALE, U.D. (2005) 'Seri-Nematoguard' - A biocontrol agent for root knot disease management in mulberry. In: *Bioorganics in Sericulture and Related Technologies of KSSRDI*. Karnataka State Sericulture Research and Development Institute Technical Publication No.70, pp 57-59.
- TOIDA, Y. (1972) Nematicidal effects of Mexican marigold, *Tagetes minota* against nematodes associated with mulberry. *Jap. J. Nematol.*, 1: 18-21.
- TOIDA, Y. (1984) Nematode species from mulberry fields and their geographical distribution in Japan. *Jap. J. Nematol.*, 14: 20-27.
- TOIDA, Y. (1991) Mulberry damages caused by a root-knot nematode, *Meloidogyne mali* indigenous to Japan. *JARQ, Japan Agricultural Research Quarterly*, 24: 300-305.
- UHLNBROCK, J.H., BIJILOO, J.D. (1958) Investigations on nematocides. Isolation and structure of nematicidal principle occurring in *Tagetes* roots. *Rec-ucelli des Travaux chimiques des Pays bus.*, 77: 1004-1009.
- WEBSTER, J.M. (1985) Interaction of *Meloidogyne* with fungi on crop plants. In: *An advanced treatise on Meloidogyne*. J.N. Sasser and C.C. Carter (Eds.), North Carolina State University, USA, pp.183-192.
- YAMASHITA, T.T., VIGLIERCHIO, D.R. (1987) Field resistance to non-fumigant nematicides in *Xiphinema index* and *Meloidogyne incognita*. *Revue de Nematologie*, 10: 327-332.
- ZHOU SHEIHIANG (1982) Identification of root-knot nematodes of mulberry. *J. Seric. Sci. China*, 8: 1-5.

LE NEMATODE DE LA RACINE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* (KOFOID ET BLANC) CHITWOOD CHEZ LE MURIER

S. D. PADMA, U. D. BONGALE, J. SUKUMAR, R. S. MALLIKARJUNAPPA &
R. N. PUSHPA

Karnataka State Sericulture Research & Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore 560062, Inde.

On a décrit le nématode de la racine, *Meloidogyne incognita* (Kofoid et Blanc) Chitwood, qui infeste le mûrier, dans tous les pays qui pratiquent la sériciculture. En général, les nématodes sont des parasites obligés, qui se nourrissent sur des organismes vivants, tels que les plantes, les champignons, les bactéries, les insectes et les animaux supérieurs. La maladie est sévère dans les pays tropicaux et subtropicaux en raison de la nature pérenne du mûrier et de l'habitude endoparasitaire du nématode. Cette maladie diminue le rendement foliaire de 10 à 12 %, tout en affectant la qualité de la feuille, ce qui a une influence sur sa valeur nutritive pour le ver à soie *Bombyx mori* L. Le coût exorbitant des pesticides, la période de toxicité résiduelle prolongée et la nature polluante des produits chimiques ont conduit à accepter des méthodes non nuisibles à l'environnement comme des options efficaces pour gérer l'infestation. Nous avons essayé de passer en revue les travaux réalisés sur la présence, la distribution, les pertes de récolte et les mesures de lutte contre *M. incognita*, qui infeste le mûrier.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* spp. L.), la seule plante hôte nourricière du ver à soie *Bombyx mori* L. est cultivé à la fois dans les pays tropicaux et tempérés du globe. L'Inde, avec 0,29 millions d'hectares de mûrier, est le deuxième plus grand producteur de soie dans le monde. L'état du Karnataka, qui est le principal producteur représente plus de 166 000 hectares (Anonyme, 1999). Le mûrier est affecté par un certain nombre de maladies provoquées par les champignons, les bactéries, les virus et les nématodes. On trouve le nématode de la racine, *M. incognita*, dans le monde entier, mais il est plus sévère dans les pays tropicaux et subtropicaux, qui pratiquent la sériciculture (Govindaiah & Sharma, 1994). Il est présent sur un large éventail de plantes hôtes et entraîne des dommages économiques pour de nombreuses cultures agricoles (Sasser, 1989). Tout en causant des dégâts directs, il est aussi impliqué dans des maladies associées avec d'autres pathogènes, permet l'entrée à de nombreux champignons pathogènes et détruit la résistance de l'hôte (Powell, 1971 ; Webster, 1985). On a bien étudié les nématodes de la racine et on a constaté qu'ils sont impliqués dans des interactions synergétiques avec d'autres microbes provoquant des maladies, où la perte de récoltes est plus grande que prévue, soit de la part d'un seul pathogène ou sous l'effet additif de deux ensembles (Franci et Wheeler, 1993).

Chez le mûrier, la maladie du nématode est associée au pathogène fongique opportuniste *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon et Maubl., qui donne le chancre de la tige et la pourriture noire de la racine, ce qui entraîne la mort des plants (Sukumar et Padma, 1999). Une muraille correctement entretenue donne environ 35 tonnes de feuilles / ha / an, tandis que la maladie diminue la production de feuilles d'environ 10 à 12 %, tout en affectant la qualité de la feuille (Govindaiah, 1990). En dehors des pertes de rendement, comme les feuilles des plantes malades sont de mauvaise

qualité, elles ont un effet sur la santé de la larve et elles diminuent le rendement en cocons ainsi que leur qualité (Gupta, 2001). La manifestation de la maladie a comme effets la formation de galles sur les racines et la croissance ralentit, avec une diminution de la formation de branches et de la vigueur de la plante (Saha et coll., 1983). Nous avons essayé de passer en revue les études réalisées sur la présence, les pertes de récolte et sur les mesures de lutte contre *M. incognita* chez le mûrier.

Distribution géographique de l'infestation par *Meloidogyne incognita* chez le mûrier :

Le nématode de la racine (*M. incognita*) qui affecte le mûrier a été rapporté dans presque tous les pays qui pratiquent la sériciculture. Bessey (1911) a rapporté *M. incognita* sur le mûrier pour la première fois aux USA et, par la suite, on l'a rapporté dans d'autres pays à savoir le Japon (Nozu, 1940), la Rhodésie et le Nyasaland (Martin, 1958), Israël (Minz, 1956), l'Australie (Colbran, 1958), l'Inde (Narayanan et coll., 1966), le Brésil (Campos et coll., 1974), l'Irak (Hussain et coll., 1977), l'URSS (Adylov, 1979) et la Chine (Zhou Sheihiang, 1982).

Hirata (1972) a révélé que parmi les huit genres de nématodes associés au mûrier, on observe plus fréquemment *Meloidogyne* spp. dans les sols alluviaux de la préfecture de Gunma au Japon. On a constaté que les champs de mûrier en Ouzbékistan (URSS) sont habités par 16 espèces de nématodes pathogènes qui incluent les espèces de *Meloidogyne*, *Rotylenchus*, *Pratylenchus*, *Longidorus* et *Aphelenchoides*. De plus, on trouve qu'environ 33 % des jeunes plants de mûrier en pépinière, sont atteints par le nématode de la racine (Adylov, 1979). Toida (1984) a observé, pendant qu'il analysait la distribution des espèces de nématodes de la racine au Japon, que *M. mali* est largement distribué sur le plan géographique. *M. hapla* et *M. mali* sont adaptés à des zones aux températures basses, tandis que *M. incognita* et *M. javanica* sont confinés à un climat chaud. Qin et coll., (1985) ont rapporté que 40 % des plantations de mûrier étudiées sont malades au Zhejiang (Chine). Les nématodes (*Meloidogyne* spp.) sont distribués dans le sol à une profondeur de 5 à 15 cm et les populations de nématodes sont plus élevées en mai et en septembre. Govindaiah (1990) a réalisé une étude dans trois zones du Karnataka en Inde et constaté une incidence de la maladie de respectivement 58, 62 et 13 % dans les zones de Bangalore, Mandya et Mysore. On constate l'incidence et l'intensité maximales de la maladie dans les sols sablonneux, dans des conditions d'irrigation, tandis que ce n'est pas le cas dans des conditions sans irrigation. Sharma et Sarkar (1997) ont réalisé une étude dans 11 localités principales de la zone de Mysore (Karnataka, Inde) où ils ont rapporté que l'incidence de la maladie est très élevée (66 %) dans du sol rouge sablonneux avec une intensité sévère à très sévère, avec 31 à plus de 100 galles et de masses d'œufs par système racinaire. On enregistre une incidence très faible dans le sol où pousse du coton noir (6 %), avec une intensité modérée de moins de 10 galles et de masses d'œufs. Parmi les différents systèmes agricoles, on constate une incidence élevée dans les champs irrigués (48 %). *M. incognita* et sa race 2 sont largement distribués dans la zone de Mysore. Philip et coll., (1997) ont aussi observé une incidence du nématode de la racine sur le mûrier dans le Taluk de Malavalli au Karnataka (Inde). Une étude réalisée par le *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute* (KSSRDI) de Bangalore en Inde, indique que le nématode est répandu et présent dans 70 à 80 % des muraies dans les zones de sériciculture intensive de l'Etat du Karnataka (Inde). La maladie est présente dans plus de 70 % des muraies, ce qui entraîne une diminution du rendement en feuilles et de leur qualité, de l'ordre de 18 à 22 % (Sukumar et Padma, 1999 ; Sukumar et Govindaiah, 2001). Bien que la maladie du nématode de la racine soit omniprésente dans l'ouest du Bengale, la maladie est plus présente dans les muraies de Malda (parfois 85 % de l'ensemble des muraies sont affectées) que dans d'autres endroits (Das et coll., 1990). Ce schéma de populations localisées des nématodes favorise l'existence d'un lien étroit entre certains facteurs édaphiques favorables et la croissance des nématodes.

Manifestation et biologie :

Puisque la feuille de mûrier est la matière première de base en sériciculture, il faut attirer l'attention sur l'importance de sa qualité. L'alimentation des vers à soie avec des feuilles malades a

un effet sur leur croissance et sur la qualité des cocons. Bien qu'on ait rapporté la maladie du nématode de la racine dès 1966 en Inde, on y a accordé de l'attention seulement à partir de 1980 et, depuis, plusieurs rapports sont disponibles et plusieurs articles ont été publiés dans différentes parties du monde. Les nématodes appartiennent à la classe des nématodes, sont omniprésents dans la nature et sont principalement présents dans le sol. Presque tous les nématodes se nourrissent sur des organismes vivants, comme les plantes les champignons, les bactéries, les insectes et les animaux supérieurs. Les nématodes parasitaires des plantes sont, en général, des parasites obligés. Ils sont transparents ou ont des annélations de surface ; sont minuscules, allongés ou en forme d'anguille et ondulent comme les serpents. Ils possèdent un stylet avec lequel ils percent les cellules intactes des plantes et injectent leurs sécrétions. Le contenu des cellules, partiellement dissous par la salive est ingéré. Les adultes bien que similaires morphologiquement sont différents, les sexes sont en général séparés. Chez *Meloidogyne* sp., les femelles sont gonflées, sacciformes et sédentaires, avec leur extrémité extérieure qui fait saillie sur la surface de la racine où les œufs s'accumulent en une masse d'œufs, ce qui induit l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules hôtes. Les mâles sont vermiformes.

Cycle de vie :

Il est constitué de l'œuf, de quatre stades juvéniles (J1, J2, J3 et J4) et de l'adulte. Quelques espèces se reproduisent par amphimixie, la plupart des espèces de *Meloidogyne* se reproduisent principalement par parthénogenèse. Il faut un à deux mois pour l'achèvement du cycle de vie. J2 infeste les plantes hôtes (Biligrani et Dube 1976).

Pathogénicité et perte de rendement :

Il existe plusieurs rapports sur le ralentissement de la croissance chez plusieurs cultures agricoles avec l'augmentation de la densité de l'inoculum. Narayan et coll., (1996) ont observé la chlorose des feuilles, une croissance étiolée de la plante et une diminution de la taille de la feuille chez les plants de mûrier sévèrement atteints par *M. incognita*. De même, Nozu (1940) au Japon et Campos et coll., (1974) au Brésil ont rapporté une croissance étiolée du mûrier et la diminution du nombre de feuilles. Suha et coll., (1983) ont rapporté la diminution de la croissance de la pousse et du rendement foliaire à cause de *M. incognita*.

Sukumar et coll., (2005) ont conclu que la maladie du nématode de la racine provoquée par *M. incognita* est l'une des principales maladies du mûrier, qui diminue à la fois le rendement (22 à 28 %) et la qualité des feuilles de mûrier.

Selon Das et coll., (1990), en raison d'une infestation élevée par le nématode de la racine, assez sévère pour provoquer des galles de la racine, il se produit une nécrose marginale, un flétrissement progressif du feuillage, la chlorose, une croissance étiolée des plants de mûrier, une perte considérable de la production en feuilles de mûrier et une détérioration de la qualité, ce qui affecte de manière négative le rendement et la qualité des cocons. L'analyse des dégâts provoqués par *M. mali*, étudiés par Toida (1991), indique que la croissance des jeunes plants et des greffes de mûrier inoculés avec plus de 2500 *M. mali* est significativement inférieure à celle des mûriers non traités. Un an après l'inoculation, 30 à 60 % des arbres infestés par les nématodes meurent. Chez les mûriers de 2 à 3 ans, inoculés avec les nématodes, le poids de la feuille diminue de 10 à 20 % et les symptômes provoqués par l'infestation par le nématode apparaissent lentement et on constate moins de dégâts par comparaison aux mûriers plus jeunes. Seinhorst (1965) a rapporté que les dégâts sont maximums pour le plant, quand la population de nématodes dépasse certaines limites. Selon Hanounik et coll., (1975), l'ampleur de la perte de la récolte dépend de facteurs tels que la densité de population de J2 présents, la sensibilité de la culture et les conditions environnementales. Govindaiah et coll., (1991) ont testé l'effet de différents niveaux d'inoculum de *M. incognita* (0, 10, 100, 1000 et 10 000 J2 / plant) sur la croissance de la plante et le développement du nématode. Ils ont rapporté que lorsque le niveau d'inoculum augmente, il y a une baisse correspondante de la croissance du plant et du rendement foliaire, allant respectivement de 8,1 à 37,4 % et de 5,2 à 29,8 %, avec différents niveaux d'inoculum.

La perte de rendement foliaire provoquée par *M. incognita*, que l'on peut éviter sur le terrain est de l'ordre de 10 à 12 %. Paul et coll., (1995) ont rapporté que l'inoculation de *M. incognita* dans les pots où on cultive les plants de mûrier entraîne une diminution significative de la croissance du plant, du rendement foliaire et de la teneur en protéines de la feuille. Les larves de ver à soie nourries avec des plants infestés par le nématode subissent une diminution significative de leur richesse soyeuse et du ratio glande séricigène / poids du corps.

Gestion du nématode de la racine :

Dans l'écosystème du sol, les plantes sont constamment exposées à la multiplicité des organismes, dont beaucoup sont des composants courants de la biosphère du sol. Puisqu'ils occupent la même niche environnementale, de tels organismes tout en influençant les plantes, sont susceptibles de s'influencer. Selon Fawcete (1931) « La nature ne fonctionne pas avec les cultures pures » et les organismes associés entraînent un syndrome de la maladie de nature complexe, qui affecte plusieurs plantes. L'analyse profonde et la prise de conscience des caractéristiques surprenantes de l'écologie microbienne ont permis le remplacement du terme « lutte » par « gestion » et puisque aucune méthode unique de lutte contre les parasites n'a donné de solution durable, très peu d'efforts globaux ont été faits pour souligner l'importance d'une stratégie de gestion intégrée de pathogènes multiples (Khan et Parvatha Reddy, 1993). De plus, le mûrier étant une culture pérenne, il est difficile de lutter contre la maladie avec une méthode unique. On adopte donc des méthodes variées pour gérer les maladies du mûrier. Les méthodes de gestion disponibles sont subdivisées ici par commodité en méthodes culturales, chimiques, biologiques et de résistance de l'hôte.

1. Méthode culturale :

Depuis quelques temps, on a accordé beaucoup d'attention à l'application de tourteaux dégraissés, de fumiers organiques et de paillage avec des plantes médicinales pour la lutte culturale contre la maladie, compte tenu du coût prohibitif des pesticides et de leur toxicité pour les êtres humains et la flore du sol. Les amendements organiques apportent une solution à long terme pour les problèmes de maladie et de sol et on recommande donc ces pratiques pour une production durable de feuilles dans la culture du mûrier. On emploie des tourteaux de margousier, de pongamia, de ricin, d'arachide puisqu'ils n'ont pas d'effet résiduel sur la plante et qu'ils améliorent aussi la croissance de la plante. Ils libèrent des quantités considérables de composés phénoliques, que l'on sait être nématocides (Khan et coll., 1974 ; Alam et coll., 1978 ; Sitaramaiha, 1987). Govindaiah et coll., (1994) ont rapporté une amélioration significative du rendement foliaire (7,8 à 22,7 %), une diminution significative du nombre de galles (70 à 85 %) et une diminution de 55 à 70 % de la production de masse d'œufs, avec l'application de 3 t / ha de tourteau de margousier. Les tourteaux non comestibles de margousier, de ricin, d'arachide, de sésame à 1 t / ha s'avèrent efficaces contre *M. incognita* chez le mûrier en diminuant le nombre de galles du nématode et en améliorant aussi la croissance de la plante et le rendement foliaire (Sikdar et coll., 1986). Sharma et coll., (1998) ont étudié l'impact du tourteau de margousier à raison de 2 t / ha / an et du carbofuran, à raison de 40 kg / ha / an en 4 doses séparées, sur la lutte contre *M. incognita*, dans les champs de fermiers et constaté une diminution de la sévérité de la maladie de 66,7 à 73 % et de 75,1 à 76,1 % grâce à l'application respective de tourteaux de margousier et de carbofuran et une augmentation du rendement foliaire de 18,8 et 16,9 %. On estime la perte de rendement foliaire de l'ordre de 12,6 à 13,7 %.

Mesures de lutte disponibles :

Groupe	Recommandation	Références
1. Produits chimiques	i) DD, EDB, DBCP ii) Phosphates organiques & carbamates iii) Aldicarbe iv) Carbofuran v) Thimet 10 G, Furadan 3G vi) Sebufos 10G	Ichinohe (1965) Hussaini (1986), Meher et Sethi (1988), Heald (1987) Sikdar et coll., 1986 Govindaiah et coll., (1993) Sarkar et coll., (1992) Sharma & Govindaiah (1995)
2) Culturelles	i) Tourteaux de margousier, de pongamia de ricin, d'arachide ii) Tourteaux de margousier, de ricin d'arachide et de sésame iii) Tourteau de margousier iv) Fumier de ferme + tourteau de margousier + souci v) Extraits de feuille de <i>Carica papaya</i> d' <i>Euphorbia synadenium</i> , de <i>Calotropis gigantea</i> et de <i>Sesamum indicum</i> vi) Extraits de feuilles et de tiges de souci mexicain (<i>Tagetes minuta</i>)	Khan et coll., (1974), Alam et coll., (1978), Sitaramaiah (1987) Sikdar et coll., (1986) Govindaiah et coll., (1994) Sukumar et coll., (2005) Philip et coll., (1993) Toida (1972)
a) Amendements organiques		
b) Paillage	i) Feuilles vertes de souci, de margousier, de pongamia, de chanvre, et de jacinthe d'eau ii) Feuilles de vertes de pongamia	Singh et Sitaramaiah (1967, 1971), Kaliram et Gupta (1982), Sharma et coll., (1985) Nandal et Bhatti (1986) Govindaiah et coll., (1989)
c) Culture associée	i) Plantes nématicides comme le souci le chanvre, le sésame, la moutarde, etc.. ii) Souci mexicain (<i>Tagetes minuta</i>)	Davide (1979), Bakker et coll., Toida (1972) Govindaiah et coll., (1991)
3. Biologiques	i) Mycorhizes arbusculaires vésiculaires (VAM) (<i>Glomus fasciculatum</i>) ii) Champignon nématophage <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Verticillium chlamydosporium</i> et VAM iii) <i>Trichoderma harzianum</i> – THN1	Chandrashekar et coll., (1997) Sharma et coll., (2001) Sukumar et coll., (2004, 2005)
4. Résistance de l'hôte	Calebressa Assam bola, S-30, ACC-115, S-1, MR-2, RFS-135, Bilidevalaya, Almora Local et Punjab Local S-1, S-3, S-14, S-30, S-34, S-54, MR-2 RFS-135	Campos et coll., (1974) Govindaiah (1990) Govindaiah et coll., (1997)

Le paillage avec des feuilles vertes de souci, de margousier, de pongamia de chanvre et de jacinthe d'eau s'avère efficace pour lutter contre les nématodes, augmenter aussi la matière organique et favoriser les microbes antagonistes dans le sol (Singh et Sitaramaiah, 1967, 1971 ; Kaliram et Gupta, 1982 ; Sharma et coll., 1985 ; Nadal et Bhatti, 1986). Govindaiah et coll., (1989) ont observé que le paillage avec des feuilles de margousier et de pongamia permet de lutter contre le nématode de la racine chez le mûrier. On constate que le paillage avec des feuilles de pongamia est supérieur à celui avec des feuilles de margousier pour améliorer la croissance de la plante et le rendement foliaire. On peut utiliser les feuilles de tous ces plants comme paillage vert dans les muraies pour diminuer l'incidence de la maladie du nématode de la racine (Philip et coll., 1993).

La culture associée de plantes nématicides, comme le souci, le chanvre, le sésame, la moutarde s'avère être très efficace contre *Meloidogyne* spp. (Davide, 1979 ; Bakker et coll., 1979). Chez le souci, *Alpha terhiyenyl*, un produit chimique inhibiteur est responsable de la lutte contre la maladie du nématode de la racine (Uhlenbrock et Bijiloo, 1958 ; Munoz et coll., 1982). Govindaiah et coll., (1991) ont rapporté des densités plus importantes de souci (*Tagetes patula*) entre les rangées de mûrier contre *M. incognita* et le paillage du sol après la pleine croissance diminue l'infestation par la maladie et permet l'amélioration du rendement foliaire.

L'utilisation de produits à base de plantes est une autre alternative pour la gestion des nématodes. Toida (1962) a rapporté l'inhibition de l'éclosion des œufs des nématodes grâce à l'extrait de feuilles et de tiges du souci mexicain (*T. minuta*), qui a pu détruire toutes les espèces *Meloidogyne* (larves J2 et nématodes vivant librement) en l'espace de 48 h. Les extraits de feuille de *C. papaya*, d'*E. synadenium*, de *C. gigantea* et de *S. indicum* à une concentration S 10 suppriment complètement l'éclosion larvaire de *M. incognita* dans des boîtes de Petri, tandis que les extraits de feuilles de *C. papaya* et d'*E. synadenium* pendant une exposition de 48 h donnent une mortalité de respectivement 100 et 96 %.

Sukumar et coll., (2005) ont aussi rapporté qu'on peut lutter contre l'intensité du nématode de la racine par des amendements du sol avec une augmentation de la dose de fumier de ferme (40 t / ha) ou par l'intégration de fumier de ferme + tourteau de margousier + souci avec des résultats comparables à ceux obtenus par traitement chimique avec le carbofuran. Les amendements organiques non seulement diminuent l'incidence et l'intensité de la maladie mais ils contribuent aussi à renforcer le sol et à améliorer la fertilité, la productivité et la santé du sol.

2. Lutte chimique :

On a réussi à gérer efficacement divers nématodes des cultures avec des produits chimiques et en conséquence les nématicides se sont avérés être des moyens fiables pour lutter contre une grande variété de nématodes. Ichinohe (1965) a passé en revue la littérature sur l'utilisation de fumigants variés chez le mûrier pour lutter contre la maladie du nématode au Japon. Il a constaté que le DD et l'EDB sont en général utilisés comme traitement avant la plantation et le DBCP comme traitement après la plantation. On utilise couramment le DBCP dans les muraies établies. Les phosphates et les carbamates organiques s'avèrent être efficaces pour lutter contre les nématodes de la racine (Hussaini, 1986 ; Meher et Sethi, 1988). Ils présentent aussi l'avantage d'être relativement peu phytotoxiques (Heald, 1987).

Parmi les différents nématicides disponibles, les fumigants comme le DD (1,2 Dichloropropane – 1,3 Dichloropropène), l'EDB (Ethylène Di Bromide) et le DBCP (Di Bromo Chloro Propane) s'avèrent plus efficaces par comparaison aux nématicides granulaires. Les fumigants bien qu'efficaces, ne sont pas économiques et sont principalement utilisés au stade de la pépinière.

Il existe des rapports sur les produits chimiques nématicides et sur des produits à base de plantes testés dans différentes parties de l'Inde. L'Aldicarbe à 30 kg / ha / an diminue significativement le nombre de galls du nématode de *M. incognita* et s'avère efficace pour la croissance de la plante et le rendement foliaire du mûrier (Sikdar et coll., 1986). Une expérience sur le terrain réalisée par Sarkar et coll., (1992) a révélé que le tourteau de margousier (1500 kg d'ingrédients actifs (a. i.) / ha / an),

le Thimet 10 G (3 kg a. i. / ha / an) et le Furadan 3 G (6 kg / a. i. / ha / an), appliqués quatre fois par an diminuent l'infestation par le nématode et augmentent le rendement foliaire du mûrier. L'application de différentes doses de Carbofuran, c'est à dire 2, 4 et 6 kg a.i / ha diminue significativement la maladie et améliore le rendement foliaire du mûrier de l'ordre de 8,5 à 27 à différentes doses par rapport au témoin (Govindaiah et coll., 1993). Dans la même étude, la diminution du pourcentage de galles du nématode et de la production de masses d'œufs est respectivement de 76 à 86,5 et de 70 et 75 % avec les différentes doses. Dans les études sur la culture en pot, le Sebufos 10G s'avère très efficace contre *M. incognita*, même à un faible dosage de 1 kg a. i. / ha. Le Durofume (éthylène dibromide + bromure de méthyle) est efficace sur le mûrier, comme traitement avant la plantation contre *M. incognita* et les mauvaises herbes, avec une diminution significative des galles du nématode (86 à 96,1 %) et de la masse d'œufs (87,9 à 97,6 %) dans les parcelles fumigées par rapport au témoin. La hauteur du plant, l'humidité de la feuille, et le rendement foliaire augmentent aussi considérablement (Govindaiah et coll., 1993). On enregistre une diminution significative de l'éclosion de J2 de *M. incognita* avec l'augmentation de la concentration de Sebufos 10 G, avec une suppression maximum de l'éclosion enregistrée avec des solutions de 1000 ppm (99,62 %) et minimum avec 100 ppm (69,70 %) (Sharma et Govindaiah, 1995). Govindaiah et coll., (1997) ont aussi rapporté que, parmi les différents traitements utilisés contre l'infestation du mûrier par *M. incognita*, le Sebufos (cadusafors) (1 à 3 kg a.i. / ha) s'avère le plus efficace. Il augmente le rendement foliaire de 10 à 14 % et diminue les galles de la racine et la production de masse d'œufs de 80 à 90 %.

3. Lutte biologique :

Le coût prohibitif des produits chimiques et leur impact négatif sur le plan écologique sont les principales contraintes qui expliquent que les priorités dans la recherche soient passées des méthodes chimiques à d'autres alternatives, parmi lesquelles l'utilisation d'agents biologiques, qui permettent d'améliorer la gestion des nématodes (Nagarajan, 1990). Le changement des priorités, qui sont passées des méthodes chimiques aux méthodes culturales, a conduit à des concepts de gestion intégrée en accordant une importance particulière aux parasites, prédateurs, champignons, bactéries, virus, et à des espèces sûres et non ciblées, aux insectes bénéfiques, aux animaux supérieurs et à l'homme avec le moins d'effets sur l'environnement et sur l'écosystème (Jayaraj, 1991). Sterling (1991) a défini le terme « lutte biologique contre les nématodes » dans le sens classique comme « une diminution des populations de nématodes, réalisée par l'action d'organismes vivants autres que les plantes hôtes résistantes aux nématodes, qui se produit naturellement ou par la manipulation de l'environnement ».

La toxicité résiduelle élevée pour les vers à soie, le coût prohibitif et l'impact négatif sur les micro-organismes du sol empêchent une adoption plus importante du Carbofuran pour lutter contre le nématode de la racine, par ailleurs, on sait aussi que les doses sub-léthales de carbofuran induisent la résistance chez *M. incognita* (Yamashita et Viglierchio, 1987). En général, on obtient cinq à sept récoltes de cocons par an et avec l'utilisation du Carbofuran, on peut manquer un ou deux élevages en raison de la toxicité résiduelle du produit chimique. La lutte biologique contre le nématode de la racine est donc la solution la plus prometteuse et la plus bénéfique pour la santé du ver à soie et du sol.

Chandrashekar et coll., 1997 ont rapporté que l'inoculation fongique de mycorhizes vésiculaires arbusculaires (VAM) chez le mûrier diminue le nombre de nématodes de la racine, des galles et la multiplication des nématodes à un degré aussi important que 63 % avec *Acaulospora laevis* et 54,2 % avec *Glomus fasciculatum*. La présence de nématodes n'a pas d'effet sur la colonisation VAM chez le mûrier. Padma et Sukumar (2004) ont pu diminuer l'incidence du nématode de la racine en employant les champignons nématophages *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium chlamydosporium* et les mycorhizes arbusculaires vésiculaires. Le Bioneema (*Verticillium chlamydosporium*) avec le tourteau de margousier, donne une incidence de maladie significativement moins importante et un rendement foliaire maximum (Sharma et coll., 2001).

On a isolé THN1-*T. harzianum*, qui parasite les masses d'œufs du nématode de la racine *M. incognita*, sur des racines de mûrier atteintes par la galle et on a évalué son potentiel pour lutter contre la maladie du nématode de la racine (Sukumar et coll., 2004). Les résultats révèlent que le champignon est aussi efficace pour lutter significativement contre la maladie dans les mûraies infestées par le nématode dans des conditions de terrain, que le champignon parasitaire des œufs le plus couramment utilisé *P. lilacinus*. La diminution de la maladie enregistrée avec THN1-*T. harzianum* est égale à celle observée chez les plantes traitées avec le nematicide carbofuran. Les résultats suggèrent aussi qu'on peut utiliser *T. harzianum* comme agent de lutte biologique puissant, non nuisible à l'environnement, contre *M. incognita* chez le mûrier sans aucune toxicité résiduelle pour les vers à soie.

Selon Sukumar et coll., (2005), la gestion de la maladie du nématode de la racine par des amendements organiques du sol est la méthode la plus efficace et la plus rentable. On peut encore améliorer l'effet de lutte contre le nématode si on enrichit les amendements avec l'agent de lutte biologique « Seri-Nematoguard ». Comme le champignon THN1-*Trichoderma harzianum* contenu dans le Seri-Nematoguard (2 kg / 0,5 ha en 2 doses séparées / an), se perpétue lui-même, est économique et sans aucun effet résiduel, il peut devenir un composant efficace dans le cadre d'un système de gestion intégrée de la maladie et permettre une lutte à long terme contre la maladie, d'une manière non nuisible à l'environnement.

4. Méthode intégrée :

Sukumar et coll., (2002) ont rapporté la méthode intégrée suivante pour lutter contre la maladie du nématode de la racine chez le mûrier :

⇒ Pour la plantation, utilisation de jeunes arbres sans nématodes.

⇒ Application de quantités suffisantes de fumier de ferme à raison de 40 tonnes / hectare en deux doses séparées.

⇒ Application de *T. viridae* ou de *T. harzianum*, ou de *P. lilacinus* à raison de 2 kg / demi-hectare en deux doses séparées

⇒ Dans les cas sévères, on recommande l'application de 800 g /demi-hectare de carbofuran.

5. Résistance de l'hôte :

Le moyen sûr et efficace de lutter contre les nématodes parasites des plantes est de mettre au point des cultivars résistant au nématode. Il y a peu de travaux réalisés sur la résistance de l'hôte chez le mûrier. Campos et coll., (1974) ont évalué quelques variétés de mûrier contre *Meloidogyne* spp. et constaté que la variété de mûrier Calabresa est assez résistante. Govindaiah (1990) a évalué 55 variétés de mûrier comprenant des variétés indigènes, exotiques, et hybrides contre *M. incognita*. Parmi 36 variétés indigènes évaluées, neuf à savoir Assam bola, S30, ACC115, S1, MR2, RFS135, Bilidevalaya, Almora Local et Punjab Local sont résistantes aux nématodes avec moins de galles et d'indice de masse d'œufs. Sur 11 variétés exotiques, Shrim 5 présente une réaction résistante et sur huit hybrides, AB × Philippines et K2 × Kokusu s'avèrent très résistants. Les variétés S30, MR2 et RFS135 présentent une réaction résistante tout en ayant des rendements élevés, et on peut les utiliser dans des programmes de lignage et aussi pour la culture sur le terrain, puisqu'elles ont été commercialisées comme des variétés améliorées. On rapporte que les variétés S1, S30, MR2 et RFS135 produisent 30 à 35 tonnes de feuilles / ha / an, à égalité avec les variétés populaires actuelles. On peut les cultiver dans les zones sujettes à la maladie du nématode de la racine comme parent donneur dans les programmes de lignage, pour l'amélioration future. Les variétés populaires S14, S54, S34 et S3, qui sont cultivées par les fermiers s'avèrent modérément résistantes (Govindaiah et coll., 1997).

Futurs axes de recherche :

- a. Etudes détaillées sur l'influence de facteurs écologiques variés sur la distribution et l'incidence de la maladie.
- b. Caractérisation moléculaire des métabolites déplaçables chez le nématode et détermination de la nature biochimique du mode d'action, de leur spécificité et compréhension de la base génétique du mécanisme d'infestation et des changements physiologiques et histologiques de la maladie.
- c. Etudes détaillées concernant la variation de la population de nématodes, par rapport aux différentes conditions agro-climatiques et évaluation de l'influence des différents types de sols.
- d. Etudes sur l'intégration de plusieurs autres méthodes de gestion sur le terrain et test des modèles de gestion intégrée des maladies associées (association maladie du nématode de la racine + pourriture de la racine) dans différentes conditions agro-climatiques et dans des situations spécifiques.

Depuis quelque temps, le nématode de la racine est devenu sévère chez le mûrier. Une approche multidisciplinaire de gestion intégrée des cultures pour lutter contre la maladie permet de protéger l'environnement de la pollution et de la toxicité résiduelle pour la flore et la faune et aussi pour la plante hôte. Le KSSRDI a conçu une méthode de lutte intégrée contre le nématode de la racine chez le mûrier grâce à des amendements organiques et des méthodes chimiques (Padma et coll., 2004). On doit orienter le travail de recherche sur cet aspect pour isoler le gène résistant, que l'on pourrait exploiter pour produire une variété résistante chez le mûrier. Bien qu'il existe quelques rapports éparés sur la présence, la distribution, les pertes de récolte et la lutte contre le nématode de la racine, *M. incognita*, responsable de la maladie du nématode de la racine chez le mûrier, il faut accorder une importance particulière aux méthodes culturales, biologiques et moléculaires de gestion de la maladie.

EPIDEMIOLOGICAL IMPORTANCE OF SILKWORM BODY SURFACE FOR PERSISTENCE OF VIRAL CONTAMINATION BY NUCLEOPOLYHEDROVIRUS OF *BOMBYX MORI* L. IN AN ARTIFICIAL REARING ENVIRONMENT

TORU ARAKAWA

National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS), Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

Epidemiological importance of silkworm body surface for retaining the contamination by nucleopolyhedrovirus of Bombyx mori (BmNPV) in the artificial rearing environment was examined. Pathogenicity of BmNPV in the litter left in a rearing cup in which BmNPV-inoculated silkworms had been reared was assayed by using a sensitive bioassay developed previously. Silkworms were inoculated with the viral occlusion body (OB) and then reared in a crowded condition (6 larvae/cup). A substantial amount of pathogenicity was constantly detected in the litter collected after the viral inoculation. When the silkworm larvae were inoculated with the OB solitarily and then reared individually in separate cups (1 larva/cup), pathogenicity was scarcely detected in the litter even though the viral inoculation dose was the same as in a crowded condition. Washing the body surface the virus-inoculated silkworms in a saline containing 0.1% Tween 20 and 1% sodium carbonate resulted in a complete disappearance of the pathogenicity in the litter even when the inoculation and rearing were performed in a crowded condition. These results suggested that the OB inoculated in a crowded condition was accumulated on the body surface of the silkworm via the larval reciprocal interferences, and the OB retained on the body surface was released little by little into the surroundings.

Keywords: Nucleopolyhedrovirus, *Bombyx mori*, BmNPV, persistence of contamination.

INTRODUCTION

Nucleopolyhedrovirus infecting a silkworm, *Bombyx mori*, (BmNPV) is one of the major pathogens causing a serious damage to sericulture. NPVs and other insect viruses are candidates for a microbial pesticide, and some are in practical use (Shieh, 1989). Development of an effective strategy to protect silkworms from viral diseases or to protect crops from insect pests by using the viral pesticide requires an advanced understanding of the viral dynamics in the rearing or natural environments. In the pathology of BmNPV, it has been shown that the dust in the sericultural farmhouse was often contaminated by the virus (Arakawa & Nozawa, 2005). In the present study, epidemiological importance of silkworm body surface for retaining the contamination by BmNPV in an artificial rearing environment was examined.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm larvae (Fuyoh × Tohkai) were reared on an artificial diet, Silkmate 2S (Nosan Corporation Co. Ltd., Yokohama), at 25 ° C with a long-day photoperiod (16L:8D). BmNPV (strain A505) was proliferated in silkworm larvae and the viral occlusion body (OB) was obtained (Arakawa, 2002).

Viral paste was prepared for the oral inoculation of OB to the silkworm. Dried mulberry leaf powder (0.2 g) was mixed with 0.1 ml of 10% (w/w) sucrose solution and 0.4 ml of the OB suspension, designated as viral paste. The final concentration of the OB in the paste was 3.61×10^8 OBs/g.

The schedule of all experimental operations is shown in Fig. 1. Twenty-four specimens of newly exuviated 4th stadium silkworm were used in every experiment. The viral inoculation to silkworms and the rearing afterwards were performed both in crowded condition (6 larvae/cup) and in solitary condition (1 larva/cup).

The crowded condition: Viral paste of 0.7 g was evenly divided into 4 parts and each of which was put on a wet filter paper in a 120 ml plastic cup. Four cups with the viral paste were prepared and newly exuviated 6 larvae were put in each of the cups. The viral paste was completely consumed in 6 h. Then the larvae were transferred to new cups containing an artificial diet on a new filter paper after they were washed as follows. Two types of washing solution were used, one of 0.1% Tween 20 in distilled water (DW) and the other of 0.1% Tween 20 plus 1% sodium carbonate in DW. Tween 20 is a mild detergent. OBs of NPV dissolve in 1% sodium carbonate due to the alkalinity. Two plastic cups containing 100 ml washing solution and a cup with 100 ml tap water were prepared. A larva was immersed in the washing solution and shaken for about 10 seconds by hand with forceps and left in the solution for 20 more seconds (1st wash). Then the larva was transferred to another cup containing the washing solution and put through the similar process (2nd wash). Thereafter the larva was rinsed in tap water in the 3rd cup by gently shaking. The cups with washing solution and tap water were discarded after 6 larvae were processed and the next 6 larvae were processed anew. Then, after 18 h of rearing on an artificial diet, the larvae were rewashed similarly and the rearing instruments and diet were replaced by new ones. Thereafter the instruments and diet were replaced similarly in every 24 h. Litter in the rearing cup was collected in every 24 h after the onset of the experiment and its pathogenicity was examined. An experiment without the washing and rinsing steps was also performed and the litter was examined for the pathogenicity.

The solitary condition: Viral paste of 0.7 g was evenly divided into 24 parts and each of which was put on a wet filter paper in a plastic cup. Twenty-four cups were prepared and 1 larva was put in each of the cups. In solitary condition, the larval body surface was not washed. Then they were reared and the litter was collected similarly as in the crowded condition. Control larvae were not inoculated with the virus.

Litter was assessed for the pathogenicity of BmNPV by using a sensitive bioassay by Arakawa & Nozawa (2005) with slight modifications as follows. Litter of 0.1 g was mixed with 3 ml solution containing 100 mM sodium pyrophosphate and 10 mM monosodium phosphate, and agitated violently with a vortex mixer for 20 min, resulting in a muddy suspension of the dispersed litter. Ten-fold dilution series of the muddy suspension were prepared with the same solution. A piece of artificial diet (about 3 g) was immersed in the dilution series, by which the surface of the diet was contaminated by the litter. Newly exuviated 3rd stadium larvae were fed with the surface-contaminated diet (10 larvae/3 g diet/cup) after they had been fed with a diet containing 0.5% Polyoxin AL wettable powder (Polyoxin AL), a fungicide inhibiting chitin synthase, for 24 h. The silkworm treated by Polyoxin AL becomes hypersensitive to BmNPV, and is easily infected by a trace amount of the virus. Two d later new clean diet was supplied into the cup (about 4 g/cup), and the larvae were reared for 4 more days. Then the larvae that died of the viral infection were counted. In this assay 30 larvae were used to assess each of the dilution series.

RESULTS AND DISCUSSION

The litter left in the rearing cup mainly consisted of feces, which contained diet debris and fibrous scraps of the filter paper used for rearing.

Table I. Detection of BmNPV pathogenicity in the litter left in rearing cups of the silkworm, *B. mori* that was inoculated with the BmNPV occlusion body and reared in crowded condition.

Tableau I. Détection de la pathogénicité de BmNPV dans les détritits laissés dans les récipients d'élevage du ver à soie, B. mori, qui est inoculé avec les corps d'occlusion de BmNPV et élevé en condition de surpopulation.

Experi- ment ^b	Rearing Cup Replicate no. ^c	No. of silkworms that died of the viral infection which were treated by the litter collected at the indicated day ^a	Nbre de vers à soie qui meurent d'infestation virale ayant été traités avec les détritits recueillis au jour indiqué ^a									
			Day 1 Jour 1			Day 2 Jour 2			Day 3 Jour 3		Day 4 Jour 4	
			10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹
1	1	1	28	4	0	16	0	0	11	0	13	0
		2	30	27	18	8	0	0	7	0	8	0
		3	28	4	0	5	1	0	5	0	14	1
		4	29	9	2	11	1	0	8	1	4	0
	2	1	27	9	1	30	8	0	5	1	21	0
		2	26	7	2	27	5	0	23	0	25	1
		3	28	6	1	28	5	1	11	0	12	1
		4	30	2	2	9	1	0	3	0	9	0
2	1	1	5	0	0	1	0	0	1	0	0	0
		2	21	1	0	1	0	0	7	0	2	0
		3	20	3	0	6	1	0	11	0	6	0
		4	12	1	0	8	0	0	5	0	2	0
	2	1	18	0	0	1	0	0	3	0	0	0
		2	14	0	0	1	0	0	2	0	6	0
		3	9	1	0	6	0	0	4	0	5	0
		4	14	1	0	4	0	0	3	0	2	0
3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Ten-fold dilution series were prepared from the litter suspension and 30 silkworms were used to assay each of the diluted suspensions. / On prépare des séries de dilution de dix à partir de la suspension de détritits et on utilise 30 vers à soie pour évaluer chacune des suspensions diluées.

^b Larval body surface was washed only with 0.1% Tween 20 (Experiment 2) or with 0.1% Tween plus 1% sodium carbonate (experiment 3) immediately after the viral inoculation period of 6 h and rewashed just after the following 18 h rearing. Silkworms in experiment 1 were not washed. / On lave la surface corporelle des larves seulement avec du Tween 20 à 0,1 % (Expérience 2) ou avec du Tween à 0,1 % plus du carbonate de sodium à 1 % (expérience 3) immédiatement après la période d'inoculation virale de 6 h et on les relave juste après les 18 h suivantes d'élevage. On ne lave pas les vers dans l'expérience 1.

^c Larvae were reared at 6 / cup, that is crowded condition. / On élève 6 larves par récipient, c'est à dire qu'elles sont dans des conditions serrées.

Table II. Pathogenicity of BmNPV in the litter left in the rearing cup of a silkworm reared solitarily ^a.**Tableau II. Pathogénicité de BmNPV dans les détritits laissés dans le récipient d'élevage d'un ver à soie élevé individuellement ^a.**

Rearing cup no.	No. of larvae that died of the viral infection which were fed a diet treated by a litter suspension of the indicated dilutions ^b					
	<i>Nbre de larves mortes d'infestation virale, après avoir été nourries avec un aliment traité avec une suspension de détritits aux dilutions indiquées ^b</i>					
No. de la tasse d'élevage	Rep. 1		Rep. 2		Rep. 3	
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹
1	3	0	1	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	2	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	2	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	1	0	0	0
9	0	0	0	0	1	0
10	0	0	1	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	1	0
14	0	0	1	0	0	0
15	0	0	2	0	0	0
16	1	0	0	0	0	0
17	0	0	3	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
21	1	0	2	0	0	0
22	0	0	3	0	0	0
23	1	0	1	0	0	0
24	2	0	0	0	0	0

^a Peroral inoculation of the viral occlusion body was performed to each of 24 silkworms solitarily, and they were reared individually in independent cups.

Litter collected 48 h after the viral inoculation was assayed.

On procède à une inoculation des corps d'occlusion virale individuellement à chacun des 24 vers à soie et on les élève de manière individuelle dans des récipients indépendants.

On évalue les détritits recueillis 48 h après l'inoculation virale.

^b The experiment was replicated three times. 30 silkworms were used to assay the pathogenicity of each of the suspensions. / *On répète l'expérience trois fois. On utilise 30 vers à soie pour évaluer la pathogénicité de chacune des suspensions.*

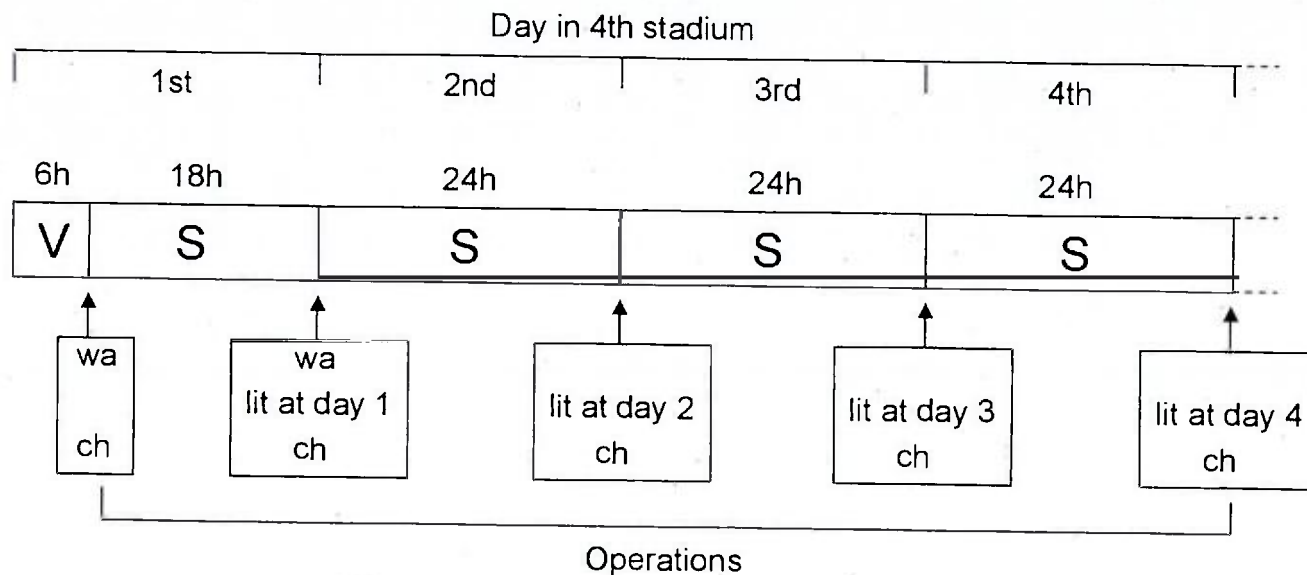


Figure 1. A schedule of experimental operations performed on the 4th stadium silkworm larvae.

V: Silkworms were fed paste of mulberry leaf powder contaminated by BmNPV inclusion bodies for 6 h. **S:** Silkworms were reared on an artificial diet, "Silkmate 2S". **wa:** The body surface of silkworms was washed immediately after the viral inoculation period of 6 h and rewashed just after the following 18 h rearing. This operation (washing) was omitted in some experiments (refer to the text). **lit:** Litter was collected every 24 h (lit at day 1 to day 4). **ch:** The rearing cup, a filter paper in the cup and artificial diet were changed with new ones after the viral inoculation period of 6 h and again after the following 18 h rearing and thereafter every 24 h.

Figure 1. Calendrier des opérations expérimentales réalisées sur des larves de ver à soie du 4^{ème} âge.

V : On nourrit les vers à soie avec une pâte à partir de poudre de feuille de mûrier contaminée par les corps d'inclusion de BmNPV pendant 6 h. **S :** On élève les vers à soie sur un aliment artificiel « Silkmate 2 S ». **wa :** On lave la surface corporelle des vers à soie immédiatement après la période d'inoculation virale de 6 h et on les relave juste après les 18 h suivantes d'élevage. Cette opération (lavage) est omise dans certaines expériences (se référer au texte). **lit :** On recueille les détritits toutes les 24 h (détritits du jour 1 au jour 4). **ch :** On remplace le récipient d'élevage, le papier filtre dans le récipient et l'aliment artificiel par de nouveaux après la période d'inoculation virale de 6 h, ainsi qu'après les 18 h suivantes d'élevage et puis toutes les 24 h.

At first, the litter from crowded condition of larvae whose body surface was not washed was analyzed. Pathogenicity of BmNPV was detected in all litter samples collected from day 1 to day 4 (experiment 1 in Table I). The larvae were transferred to new rearing cups with new diet every day. Thus, this pathogenicity must not come from the initial contamination of the instruments derived from the viral paste. The virus would be supplied by the larvae themselves. Initially, it was inferred hypothetically that the pathogenicity existed specifically in feces fraction in the litter, which originated from the infected gut cells that were discarded with feces as a defense reaction of the host (Engelhard & Volkman, 1995; Keddie *et al.*, 1989). To analyze the dynamics of the virus in feces more precisely, the litter was separately collected from each of the individual specimens that were processed solitarily.

In the present study 0.1 g of the litter was submitted to assess the pathogenicity. In solitary rearing, the litter at day 1 did not amount to 0.1 g in weight. Thus the litter at day 2 was examined. If the pathogenicity in litter originates from the infected gut cells discarded by the host, the feces from solitary condition would contain the same degree of pathogenicity as in the crowded condition. Contrary to that expectation, pathogenicity was scarcely detected in the litter (Table II). These results were quite surprising, and suggested some other origin(s) for that pathogenicity than the infected gut tissue. Then, possible contamination on the body surface was targeted.

In a crowded condition with larvae that were washed by 0.1% Tween 20 only, a substantial degree of pathogenicity was detected in almost all litter samples collected from day 1 to day 4 (experiment 2 in Table I). Washing the larvae by 0.1% Tween 20 plus 1% sodium carbonate resulted in complete disappearance of the pathogenicity in the litter (experiment 3 in Table I). These results suggest that the pathogenicity in litter comes from somewhere on the body surface that can be washed out externally. In all the above experiments, no pathogenicity was detected in the litter from control larvae (data not shown).

From these results, several characteristics of the viral dynamics in a rearing condition are recognized. The larvae contacting an infection source carries the pathogen on the body surface. The interference between the larvae in a crowded condition would be important for the viral loading on the body. The pathogenicity on the body is released little by little into the surroundings and is detected in the litter. The viral release occurs continuously during the silkworm rearing until the larvae die.

The pathogenicity persisted in a rearing environment effectively where the larvae were crowded. In solitary condition the pathogenicity does not show such a dynamics. These are consistent with a general understanding that epidemic diseases often break out in a crowded population of the silkworm (Kawase, 1990). In insect pathology, the importance of the crowdedness has been asserted based mainly on frequent disease prevalence in a crowded condition. Positive correlation between the host population density and the mortality level caused by artificially inoculated pathogens was observed (Vasconcelos *et al.*, 2002). It has been taken for granted that an individual insect whose surface was contaminated by pathogens by getting into touch with an infected carcass scatters the pathogen in the insect population. Body surface-mediated NPV dissemination has been studied by using an adult moth of tobacco budworm, *Heliothis virescens*, which aims at managing the progeny worms by utilizing viral autodissemination (Jackson *et al.*, 1992). By using not an adult but a larva, however, such an epidemiological function of the contaminated body surface has been poorly evidenced. In sericultural pathology, the present study is the first report showing the positive correlation between the pathogen level in the rearing environment and the host population density, in which the larval body surface functions definitively. The processes of viral accumulation on the body and of viral release into the surroundings are themes for future research.

The pathogenicity was retained fast on the body surface and was not removed easily by washing, which would contribute to a prolonged persistence of the virus in the environment. It would increase the risk of disease outbreak. If this is the case applicable to other virus-host systems in the natural environment, it would be expected that rain could not easily wash away the virus contaminating an

insect field population. Thus, the elucidation of the process of viral attachment on and of viral release from the body surface is important not only for sericulture but also for agricultural pest management.

Ali *et al.* (1987) suggested that artificially inoculated NPV of *Heliothis zea* (HzNPV) was accumulated on the larval surface of *H. zea* and released into the surroundings little by little during the rearing. There are, however, some discrepancies between the result of the present study and that by Ali *et al.* (1987). HzNPV OBs were effectively accumulated on larvae in a solitary condition of viral inoculation and larval rearing. The pathogen on the body was released into the surroundings even from the "surface-sterile" larvae. These are contrary to the results of the present study. Comparative studies carefully planned using lots of different insect-virus systems are required to attain a comprehensive understanding of the viral dynamics.

In the study of viral transmission from infected to healthy lepidopterous larvae, the feces are a research target for the pathogenicity. Several studies have suggested that pathogenicity does not appear in feces of infected larvae except in feces excreted immediately before death by the viral infection (Ali *et al.*, 1987; Kawase, 1990; Vasconcelos, 1990). Contrary to these reports Jaques (1962) detected weak pathogenicity in feces of *Trichoplusia ni* larvae collected not only at the final stage of the disease by TnNPV but also at earlier stages. Jaques (1962) inferred that the pathogenicity in feces at earlier stages originated from the infected internal tissues. Based on the present results, however, the pathogenicity in feces was potentially caused by the virus contaminating the larval body surface that was released onto feces after the feces were excreted. Considering the present study and the above reports, the host tissue infected by NPV would not supply the pathogen into feces until the diseased host reached the final stage of infection. In *B. mori*, several aspects of fecal pathogenicity were shown by the present study and a previous report (Arakawa, 2007) as follows. The feces excreted immediately after oral inoculation of OBs contain the occlusion-derived virus (ODV) that is released from the ingested OBs and passing through the gut. Thereafter, viral pathogenicity disappears from feces and can not be detected for 4 d. Then, viral OBs not the ODV appear in feces immediately before death by the viral infection.

The results of this study present some suggestions important to the study of the viral vertical transmission in insects. Whether or not NPV infecting a parent specimen is transmitted to the progeny transovarially as a latent virus in an egg is in dispute (Kukan, 1999; Neelgunt & Mathad, 1978). If there appeared some diseased individuals among a brood of progenies originating from an egg mass whose surface was washed after it was oviposited by a virus-carrier female, it has been presumed that the infection of the progeny was caused by a latent virus that was concealed in eggs while the eggs were in the female ovary. In the present study it was shown that the virus was retained fast on the larval body surface and released into surroundings little by little, and a strong washer was required to wash away the virus. Thus, the propriety of the washing procedures that have been so far used for washing eggs should be re-examined.

REFERENCES

- ALI M. I., YOUNG S. Y. & YEARIAN W. C. (1987) Nuclear polyhedrosis virus transmission by infected *Heliothis Zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) prior to death. *J. Entomol. Sci.*, 22, 289-294.
- ARAKAWA T. (2002) Promotion of nucleopolyhedrovirus infection in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) by flufenoxuron. *Appl. Entomol. Zool.*, 37, 7-11.
- ARAKAWA T. & NOZAWA M. (2005) A sensitive bioassay for a nucleopolyhedrovirus using silkworms, *Bombyx mori* L., previously treated with a chitin synthesis inhibitor. *Appl. Entomol. Zool.*, 40, 105-111.
- ARAKAWA T. (2007) Bioassay of nucleopolyhedrovirus of a silkworm, *Bombyx mori* L., (BmNPV) discriminating the pathogenicity caused by the free virion from that caused by the viral occlusion body. *Appl. Entomol. Zool.*, 42, 439-448.

- ENGELHARD E. K. & VOLKMAN L. E. (1995) Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 209,384-389.
- JACKSON D. M., BROWN G. C., NORDIN G. L. & JOHNSON D. W. (1992) Autodissemination of a baculovirus for management of tobacco budworms (Lepidoptera: Noctuidae) on tobacco. *J. Econ. Entomol.* 85,710-719.
- JAKES R. P. (1962) The transmission of nuclear-polyhedrosis virus in laboratory populations of *Trichoplusia ni* (Huber). *J. Invertebr. Pathol.*, 4,433-445.
- KAWASE S. (1990) Recent research on the nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 59,387-401 (in Japanese).
- KEDDIE B. A., APONTE G. W. & VOLKMAN L. E. (1989) The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science*, 243,1728-1730.
- KUKAN B. (1999) Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 74,103-111.
- NEELGUND Y. F. & MATHAD S. B. (1978) Transmission of nuclear polyhedrosis virus in laboratory population of the armyworm, *Mythimna (Pseudaletia) separata*. *J. Invertebr. Pathol.*, 31,143-147.
- SHIEH T. R. (1989) Industrial production of viral pesticides. *Adv. Virus Res.*, 36,315-343.
- VASCONCELOS S. D. (1996) Alternative routes for the horizontal transmission of a nucleopolyhedrovirus. *J. Invertebr. Pathol.*, 68,269-274.
- VASCONCELOS S. D., CORY J. S., SPEIGHT M. R. & WILLIAMS T. (2002) Host stage structure and baculovirus transmission in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: a laboratory examination of small scale epizootics. *Neotropic. Entomol.* 31,391-396.

IMPORTANCE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA SURFACE DU CORPS DU VER A SOIE, POUR LA PERSISTANCE DE LA CONTAMINATION PAR LE VIRUS DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE DE *BOMBYX MORI* L., DANS UN ELEVAGE SUR ALIMENT ARTIFICIEL

TORU ARAKAWA

National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS), Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japon.

*Nous avons examiné l'importance épidémiologique de la surface du corps du ver à soie pour retenir la contamination par le virus de la polyédrose nucléaire de **Bombyx mori** (BmNPV), dans un environnement d'élevage artificiel. On a évalué la pathogénicité de BmNPV dans les détritits laissés dans le récipient d'élevage de vers à soie inoculés avec BmNPV, en utilisant une évaluation biologique sensible mise au point auparavant. On inocule les vers à soie avec des corps d'occlusion viraux (OB) et on les élève ensuite dans des conditions serrées (6 larves / récipient). On détecte constamment une quantité importante de pathogènes dans les détritits recueillis après l'inoculation virale. Quand on inocule les larves de ver à soie avec des OB de manière individuelle et qu'on les élève individuellement dans des récipients séparés (1 larve / récipient), on détecte à peine de pathogénicité dans les détritits, bien que la dose d'inoculation virale soit la même que dans une condition serrée. Lorsqu'on lave la surface corporelle des vers à soie, inoculés avec le virus, dans une solution saline contenant 0,1 % de Tween 20 et 1 % de carbonate de sodium, cela entraîne la disparition complète de la pathogénicité dans les détritits, même quand on procède à l'inoculation et à l'élevage dans des conditions serrées. Ces résultats suggèrent que les OB inoculés dans une condition de surpopulation s'accumulent sur la surface corporelle du ver à soie, via les interférences larvaires réciproques et que les OB retenus sur la surface corporelle, sont libérés petit à petit dans l'environnement.*

INTRODUCTION

Le virus de la polyédrose nucléaire qui infeste le ver à soie, *Bombyx mori* (BmNPV) est l'un des principaux pathogènes qui entraînent des dégâts importants pour la sériciculture. Le NPV et d'autres virus d'insectes sont candidats pour être utilisés comme insecticides et certains sont effectivement utilisés dans la pratique (Shieh, 1989). La mise au point d'une stratégie efficace pour protéger les vers à soie des maladies virales ou pour protéger les cultures des insectes parasites en utilisant un pesticide viral, nécessite une compréhension poussée de la dynamique virale dans l'élevage ou dans l'environnement naturel. Concernant la pathologie de BmNPV, on a montré que la poussière des magnaneries est souvent contaminée par le virus (Arakawa et Nozawa, 2005). Dans cette étude, nous avons examiné l'importance épidémiologique de la surface corporelle du ver à soie pour retenir la contamination par BmNPV dans un élevage sur aliment artificiel.

MATERIELS ET METHODES

On élève les larves de vers à soie (Fuyoh × Tohka) sur un milieu artificiel Silkmate 2S (Nosan Corporation Co. Ltd., Yokohama) à 25° C avec une longue photopériode de lumière (16 L : 8 O). On

fait proliférer BmNPV (souche A505) chez les larves de ver à soie et on obtient les corps d'occlusion viraux (OB) (Arakawa, 2002). On prépare la pâte virale pour l'inoculation orale d'OB au ver à soie. Pour cela, on mélange de la poudre de feuille de mûrier sèche (0,2 g) avec 0,1 ml de 10 % (w / w) de solution de saccharose et 0,4 ml de suspension d'OB. La concentration finale des OB dans la pâte est de $3,61 \times 10^8$ OBs /g.

Le calendrier de toutes les opérations expérimentales est présenté dans la Fig. 1. Dans chaque expérience, on utilise vingt quatre spécimens de vers à soie du 4^{ème} âge venant de muer. On procède à l'inoculation virale des vers à soie et ensuite à l'élevage, dans des conditions de surpopulation (6 larves / récipient) et en individuel (1 larve / récipient).

Condition surpeuplée :

On divise 0,7 g de pâte virale en 4 parties égales et on place chaque partie sur un filtre en papier mouillé dans un récipient en plastique de 120 ml. On prépare quatre récipients avec de la pâte virale et on place 6 larves venant de muer dans chacun des récipients. La pâte virale est complètement consommée au bout de 6 h. Puis, on transfère les larves dans de nouveaux récipients contenant du milieu artificiel sur un nouveau papier et ensuite on les lave comme suit. On utilise deux types de solution de lavage, l'une à 0,1 % de Tween 20 dans de l'eau distillée (DW) et l'autre à 0,1 % de Tween 20 plus 1 % de carbonate de sodium dans DW. Le Tween 20 est un détergent doux. Les OB de NPV se dissolvent dans 1 % de carbonate de sodium, en raison de l'alcalinité. On prépare deux récipients en plastique, contenant 100 ml de solution de lavage et un récipient avec 100 ml d'eau du robinet. On immerge une larve dans la solution de lavage et on la secoue pendant environ 10 secondes à la main avec des pinces et on la laisse dans la solution pendant 20 secondes supplémentaires (1^{er} lavage). Puis on transfère la larve dans un autre récipient contenant la solution de lavage et on la fait passer par un processus similaire (2^{ème} lavage). Puis, on rince la larve à l'eau du robinet dans le 3^{ème} récipient en la secouant doucement. On jette les récipients avec la solution de lavage et l'eau du robinet après avoir traité 6 larves et les 6 larves suivantes sont à nouveau traitées. Puis, au bout de 18 h d'élevage sur milieu artificiel, on relave les larves de manière similaire et on remplace les instruments d'élevage et l'aliment. On remplace les instruments et l'aliment de manière similaire toutes les 24 h. On recueille les détritres dans le récipient d'élevage toutes les 24 h après le début de l'expérience et on examine la pathogénicité. On réalise aussi une expérience, sans les étapes de lavage et de rinçage, et on examine la pathogénicité des détritres.

Condition en individuel :

On divise la pâte virale de 0,7g en 24 parties égales et on place chacune d'elles sur un filtre en papier mouillé dans un récipient en plastique. On prépare vingt quatre récipients et on place 1 larve dans chacun des récipients. Dans la condition solitaire, on ne lave pas la surface corporelle. Puis, on les élève et on recueille les détritres de la même manière que dans la condition surpeuplée. On n'inocule pas les larves témoins avec le virus.

On évalue la pathogénicité des détritres par rapport à BmNPV en utilisant une évaluation biologique sensible selon Arakawa et Nozawa (2005), avec de légères modifications comme suit. On mélange 0,1 g de détritres avec 3 ml de solution contenant 100 mM de pyrophosphate de sodium et 10mM de phosphate monosodique et on l'agite violemment avec un mélangeur à turbulence pendant 20 min., ce qui donne une suspension boueuse des détritres dispersés. On prépare des séries de dilution de dix de la suspension boueuse avec la même solution. On immerge un morceau de milieu artificiel (environ 3 g) dans une série de dilution, par laquelle la surface du milieu est contaminée par les détritres. On nourrit des larves du 3^{ème} âge venant de muer avec l'aliment dont la surface est contaminée par les détritres (10 larves / 3g d'aliment / récipient), après les avoir nourries avec un aliment contenant de la poudre mouillable de Polyoxin AL (Polyoxin AL) à 0,5 %, un fongicide inhibant la chitine synthase pendant 24 h. Le ver à soie traité avec de la Polyoxine AL devient

hypersensible à BmNPV et il est facilement infesté par une quantité trace du virus. Deux jours plus tard, on apporte un nouveau milieu propre dans le récipient (environ 4 g / récipient) et on élève les larves pendant 4 jours supplémentaires. Puis, on compte les larves qui meurent de l'infestation virale. Dans cette évaluation, on utilise 30 larves pour chacune des séries de dilution.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les détritits laissés dans le récipient d'élevage sont principalement constitués d'excréments, qui contiennent des débris de milieu et des bouts fibreux du papier filtre. Au début, on analyse les détritits des larves, élevées dans des conditions serrées, dont la surface corporelle n'a pas été lavée. On détecte la pathogénicité de BmNPV dans tous les échantillons de détritits recueillis, du jour 1 au jour 4 (expérience 1 dans le Tableau I). On transfère les larves dans les nouveaux récipients d'élevage avec un nouveau milieu chaque jour. Cette pathogénicité ne doit donc pas venir de la contamination initiale des instruments provenant de la pâte virale. Le virus doit être apporté par les larves elles-mêmes. Au début, on a émis l'hypothèse, que la pathogénicité existait spécifiquement dans la partie des excréments contenus dans les détritits et provenait des cellules infestées de l'intestin qui sont expulsées avec les excréments, comme une réaction de défense de l'hôte (Engelhard & Volkman 1995 ; Keddie et coll., 1989). Pour analyser la dynamique du virus plus précisément dans les excréments, on recueille séparément les détritits de chacun des spécimens individuels, qui ont été traités individuellement.

Dans cette étude, on évalue la pathogénicité de 0,1 g de détritits. Dans l'élevage individuel, le premier jour, les détritits ne représentent que 0,1 g en poids. On examine donc les détritits, le 2^{ème} jour. Si la pathogénicité des détritits provient des cellules infestées de l'intestin dont l'hôte se débarrasse, les excréments dans la condition en individuel devraient contenir le même degré de pathogénicité que dans la condition de surpopulation. Contrairement à cette attente, on détecte à peine de pathogénicité dans les détritits (Tableau II). Ces résultats sont assez surprenants et suggèrent que la pathogénicité a une autre origine que le tissu infesté de l'intestin. On se concentre donc sur la contamination possible par la surface corporelle.

Dans une condition surpeuplée, quand on lave les larves avec seulement 0,1 % de Tween 20, on détecte un degré important de pathogénicité dans presque tous les échantillons de détritits, recueillis du jour 1 au jour 4 (expérience 2 dans le Tableau I). Lorsqu'on lave les larves avec 0,1 % de Tween 20 plus 1 % de carbonate de sodium, cela entraîne la disparition complète de la pathogénicité dans les détritits (expérience 3 dans le Tableau I). Ces résultats suggèrent que la pathogénicité dans les détritits provient de la surface corporelle, que l'on peut nettoyer extérieurement. Dans toutes les expériences ci-dessus, on ne détecte aucune pathogénicité dans les détritits des larves témoins (données non présentées).

D'après ces résultats, on reconnaît plusieurs caractéristiques de la dynamique virale dans une condition d'élevage. Les larves qui sont au contact d'une source d'infestation transportent le pathogène sur leur surface corporelle. Dans une condition de surpopulation, l'interférence entre les larves serait importante pour le chargement viral sur le corps. La pathogénicité du corps se libère petit à petit dans les environs et on la détecte dans les détritits. La libération virale se produit continuellement pendant l'élevage du ver à soie, jusqu'à ce que les larves meurent.

La pathogénicité persiste réellement dans un environnement d'élevage où les larves sont serrées. Dans l'élevage individuel, la pathogénicité ne présente pas une telle dynamique. Cela concorde avec l'opinion générale selon laquelle les épidémies se produisent souvent dans une condition de surpopulation des vers à soie (Kawase, 1990). Dans la pathologie des insectes, on connaît l'importance de la surpopulation, basée principalement sur la prédominance fréquente des maladies dans une condition surpeuplée. On a observé une corrélation positive entre la densité de la population de l'hôte et le niveau de mortalité, provoqué par l'inoculation artificielle des pathogènes (Vasconcelos et coll., 2002). On tient pour certain qu'un insecte individuel, dont la surface a été contaminée par les

pathogènes en rentrant en contact avec une carcasse infestée, répand le pathogène dans la population d'insectes. On a étudié la dissémination de NPV par l'intermédiaire de la surface corporelle en utilisant un papillon adulte du ver du bourgeon du tabac, *Heliothis virescens*, dans le but de gérer la descendance des vers par l'utilisation de l'autodissémination virale (Jackson et coll., 1992). Cependant, en utilisant non pas un adulte mais une larve, on n'a pas correctement prouvé la fonction épidémiologique de la surface corporelle contaminée. Dans la pathologie séricicole, cette étude est le premier rapport présentant une corrélation positive entre le niveau de pathogènes dans l'environnement d'élevage et la densité de la population hôte, où la surface corporelle de la larve a manifestement une fonction. Les processus d'accumulation virale sur le corps et de libération du virus dans l'environnement sont de futurs thèmes de recherche.

La pathogénicité est vite fixée sur la surface corporelle et ne s'élimine pas facilement au lavage, ce qui contribuerait à la persistance prolongée du virus dans l'environnement. Cela augmenterait le risque d'éruption de maladie. Si cela s'applique à d'autres systèmes virus-hôte dans l'environnement naturel, on peut penser que la pluie ne lave pas facilement le virus contaminant une population d'insectes sur le terrain. L'élucidation du processus d'attachement viral et de la libération virale de la surface corporelle est importante non seulement pour la sériciculture mais aussi pour la gestion des parasites agricoles.

Ali et coll., (1987) ont suggéré que le NPV d'*Heliothis zea* (HzNPV) inoculé artificiellement, s'accumule sur la surface de la larve de *H. zea* et se libère dans les environs petit à petit pendant l'élevage. Cependant, il y a certaines divergences entre le résultat de cette étude et celle d'Ali et coll., (1987). Les OB d'HzNPV s'accumulent réellement sur les larves avec l'inoculation virale et l'élevage larvaire en individuel. Le pathogène sur le corps est libéré dans les environs, même pour les larves dont la surface est stérile. Cela est contraire aux résultats de notre étude. Des études comparatives programmées avec soin, en utilisant de nombreux systèmes différents insecte-virus sont nécessaires pour aboutir à une compréhension globale de la dynamique virale.

Dans l'étude de la transmission virale de larves lépidoptères infestées à des larves saines, les excréments sont une cible de recherche par rapport à la pathogénicité. Plusieurs études ont suggéré que la pathogénicité n'apparaît pas dans les excréments des larves infestées sauf dans les excréments expulsés immédiatement avant la mort par infestation virale (Ali et coll., 1987 ; Kawase, 1990 ; Vasconcelos, 1990). Contrairement à ces rapports, Jaques (1962) a détecté une faible pathogénicité dans les excréments des larves de *Trichoplusia ni* recueillis non seulement au stade final de la maladie par TnNPV mais aussi aux stades antérieurs. Jaques (1962) en a déduit que la pathogénicité dans les excréments aux stades antérieurs provient des tissus internes infestés. Cependant, d'après ces résultats, la pathogénicité dans les excréments est potentiellement provoquée par le virus contaminant la surface corporelle de la larve, qui a été libéré sur les excréments après que les excréments aient été expulsés. En tenant compte de cette étude et des rapports cités plus haut, le tissu de l'hôte infesté par NPV permettrait au pathogène de n'être contenu dans les excréments que lorsque l'hôte malade atteint le dernier stade d'infestation. Chez *B. mori*, cette étude ainsi qu'un rapport antérieur montrent plusieurs aspects de la pathogénicité fécale (Arakawa, 2007), qui sont les suivants. Les excréments expulsés immédiatement après l'inoculation orale d'OB contiennent le virus dérivé de l'occlusion (ODV), qui est libéré des OB ingérés et passe par l'intestin. Par la suite, la pathogénicité virale disparaît des excréments et on ne peut pas la détecter pendant 4 jours. Puis, les OB viraux et non pas les ODV apparaissent dans les excréments, immédiatement avant la mort par l'infestation virale.

Les résultats de cette étude contiennent des suggestions importantes concernant l'étude de la transmission virale verticale chez les insectes. Il existe un débat sur le fait que NPV infestant un spécimen parent soit transmis de manière transovarienne ou non à la descendance (Kukan, 1999 ; Neelgunt et Mathad, 1978). S'il apparaît des individus malades dans la descendance provenant d'une masse d'œufs, dont la surface a été lavée après qu'elle ait été pondue par une femelle transportant le virus, on pourrait en déduire que l'infestation de la descendance est provoquée par un virus latent, qui est caché dans les œufs, tandis que les œufs sont dans l'ovaire de la femelle. Dans cette étude,

nous avons montré que le virus est rapidement retenu sur la surface corporelle de la larve et libéré dans l'environnement petit à petit et qu'il faut procéder à un lavage soigneux pour enlever le virus. Il faudrait donc re-examiner les propriétés des procédures de lavage qui ont été utilisées jusqu'à présent pour laver les œufs.

DEVELOPMENT OF *NOSEMA BOMBYCIS* NAEGELI IN THE OVARY, ITS IMPACT ON EGG PRODUCTION AND DISEASE TRANSMISSION IN SILKWORM *BOMBYX MORI* L

N. B. JYOTHI & C. S. PATIL*

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore-560 062, India. Telephone: Off- 091 - 080-28435221. Res- 091-080-28425821.
E mail : jyothi_achaiiah@yahoo.com

Nosema bombycis that cause pebrine disease spreads both horizontally and vertically in the silkworm population. Infection of *N. bombycis* to the silkworm ovary and concurrent histopathological changes at different developmental stages of ovary, its effect on seed parameters and pebrine disease transmission in the progeny were studied. Infection of *N. bombycis* to the ovary of silkworm *Bombyx mori* revealed enormous production of spores in the epithelial layer by 10 days of post infection (pi). Infection spread to almost all the tissues of ovary including fibrous matrix, germinal sheath, ovariole sheath, cystocytes in the larval stage and subsequently to the nurse cells and oocytes in the pupal stage by 16 days of pi. After differentiation of ovary into egg chambers, the developmental stages of the parasite were also observed in the follicular epithelium, yolk granules and inter follicular stalk. Although, ovary contained all vegetative and spore stages of *N. bombycis*, the rate of multiplication and production of spores was low compared to other organs of the same host. Depletion of host cytoplasmic component and lysis of the cellular components around the spore was a common feature. Fecundity, hatchability and diseased population in the progeny of both infected female crossed with infected male or uninfected male are dependent on the spore load administered during larval stage to the female moth.

Keywords: *Nosema bombycis*, *Bombyx mori*, histopathology, ovary, pebrine disease transmission.

INTRODUCTION

Pebrine disease caused by *Nosema bombycis* is a serious disease of silkworm *Bombyx mori* because of the prevalence of transovarial mode of transmission of the pathogen. If healthy larvae feed on contaminated mulberry leaves during late instar (IV & V), such larvae spin cocoons and emerge normally but deposit transovarially infected eggs (Han and Watanabe, 1988). The rate of pebrine disease transmission and degree of infection in the offspring is directly related to the intensity of infection in the mother moth (Griyaghey and Sengupta, 1989; Talukdar, 1995).

Although, the impact of microsporidian development including their stages in the gonads of insects have been reported in many Lepidopterans (Fine, 1984), there are mixed opinions regarding different developmental stages of the parasite and the regions of gonad harbouring them. Schizogonic stages of *N. heliothidis* were observed in the nurse cells and oocytes of *Heliothis zea* ovarioles but not spores (Brooks, 1968). *N. bombycis* is harboured in the peritoneal sheath and yolk granules in the female silk moth (Wafa and Kotby, 1971).

* Author for correspondence

In case of silkworm though the occurrence of vertical transmission of *N. bombycis* is well documented, the specific pattern of infection in the ovary and subsequently in the eggs has not been well understood. The present study is on the infection of *N. bombycis* to silkworm and the concurrent histopathological changes at different developmental stages of silkworm ovary, its implication on seed production and transovarial transmission.

MATERIAL AND METHODS

Histopathology:

Silkworms of bivoltine race, NB4D2 were individually infected per orally with 10^6 spores/larva on III instar 1st day (I batch) and V instar 1st day (II batch). Infective feeding was administered once and subsequently distilled water washed leaf was given daily to avoid secondary contamination. Silkworms of I batch were dissected on V instar 1st day (10 days pi), V instar 6th day (15 days pi); and pupae on 8th day from batch II (16 days pi). The ovary was dissected out, fixed in Karnovsky's fixative, post fixed in osmium tetroxide and embedded in Epon-Araldite (Jyothi, 2002). Semi-thin sections of 0.80 μ m were cut using Reichert Jung Ultra microtome (Germany), stained with 2 % aqueous crystal violet and screened for the presence of spores under the light microscope and photographs were taken. Ultra thin sections of 80nm was cut, stained with uranyl acetate and lead citrate and observed under transmission electron microscope (Make: Jeol CX II-100, Japan).

Effect of *N. bombycis* infection on seed parameters:

The stock spore load of 10^7 spores/ml was diluted serially up to 10^3 spores/ml. Silkworm larvae of bivoltine race, NB4D2 were infected per orally on 1st day of V instar by feeding 3 cm² cut mulberry leaf smeared with 0.01 ml of pebrine spore suspension to individual larvae. Thus, batches fed with 10^5 spores/larva to 10 spores/larva were maintained. An uninfected control batch was maintained separately. On the day of spinning, worms were mounted on chandrike (mountage) for cocooning. Sexing of pupae was done on the 8th day of pupation and maintained separately. After moth emergence, they were allowed to mate in the following combinations under each spore load,

IF $\times$ IM, IF $\times$ UM and UF $\times$ UM (Control)

Where IF means Infected female, IM - Infected male, UF - Uninfected female and UM - Uninfected male.

After copulation for 5-6 h, female moths were allowed to lay eggs for 24 h and then mother moth was tested to confirm infection. After hatching, the worms were individually tested under light microscope for pebrine disease by squashing the worm under a cover slip with a drop of 2 % KOH. The percent infection was calculated in each crossing. The number of hatched, dead and unfertilized eggs in the egg card was recorded. Data was subjected for analysis of variance (ANOVA). For each spore load (treatment) ten pairs of moths were maintained and the experiment was repeated three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of *N. bombycis* infection on the ovary:

The ovaries in the infected larvae showed white pustules when observed *in toto* at 15 days pi. Longitudinal section of the ovary after 10 days pi revealed an enormous production of parasite in the double-layered peritoneal sheath (epithelial layer). The infection in the peritoneal sheath of the ovary was more intense compared to the precursor cells (Fig. 1). The elongated follicles become tubular and differentiated into 4 ovarioles or ovarian tubules from each ovary by V instar 6th day.

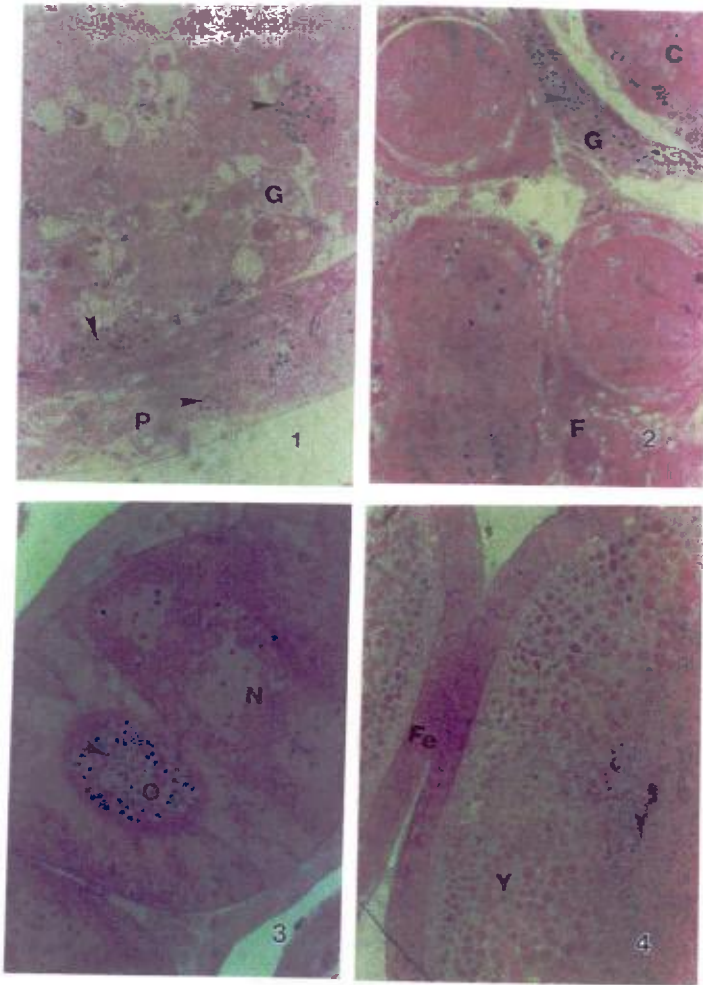


Fig. 1. Longitudinal Section (L. S.) of the silkworm ovary in V instar 1st day. Spores (→) are evident in the peritoneal sheath (P) and germ cells (GC). ×400.

Fig.1. Coupe longitudinale (L. S.) de l'ovaire du ver à soie, le premier jour du 5^{ème} âge. Les spores (→) sont évidentes dans la gaine (P) et dans les cellules germinales (GC) × 400.

Fig. 2. L. S. of the pupal ovary. Parasite is noticed in the cytotypes (C), germinal cells, germarium (G) and fibrous matrix (F). × 400.

Fig. 2. L. S. de l'ovaire nymphal. On remarque le parasite dans les cytotypes (C), dans les cellules germinales, dans le germarium (G) et dans la matrice fibreuse (F). × 400

Fig. 3. L. S. of the differentiating ovarioles within the pupal ovary. Parasite (→) is seen in the oocyte (O) and nurse cells (N). × 400

Fig. 3. L. S. des ovarioles qui se différencient à l'intérieur de l'ovaire nymphal. On voit le parasite (→) dans l'ovocyte (O) et dans les cellules nourricières (N). × 400.

Fig. 4. L. S. of the egg in the ovariole. Infected yolk granules (Y) and follicular epithelium (Fe). × 160.

Fig. 4. L. S. de l'œuf dans l'ovariole. Granules du jaune infectés (Y) et épithélium folliculaire (Fe) × 160.

At this stage i.e. at 15 days pi, in addition to the epithelial layers the parasite was found attacking the fibrous matrix (Fig. 2 and 7), germinal cells, ovariole sheath and cystocytes (Fig. 2 and 5). Observations after 5-6 days of pupation (16 days pi) revealed the development of parasite and their stages both in the nurse cells and oocytes (Fig. 3 and 6). Further, with the differentiation of the egg into individual chambers, the parasite was observed in various developmental stages in the follicular epithelium, yolk granules and interfollicular stalk (Fig. 4 and 9). Although the egg had all vegetative and spore stages of the parasite *N. bombycis*, the rate of multiplication and production of spores were less compared to other tissues in the same host. However, depletion of host cytoplasmic components and lysis of the cellular components like ribosome and mitochondria around the spore was a common feature (Fig. 7-9). The germ cells were severely infected in individuals that had heavy infection or with longer post infection period.

Effect of *N. bombycis* infection on silkworm seed parameters and disease transmission:

i. IF × IM cross:

Fecundity reduced significantly in the batches where both male and female moths were pebrine infected and crossed. Low fecundity (264.20) and low hatching percentage (52.80 %) was recorded in the batch infected with 10^5 spores/larva compared to uninfected control while the same was as high as 483.65 and 95.85 % respectively in batches infected with 10 spores/larva (Table I). Decrease in the spore load administration during larval period increased the fecundity. Even between treatments the fecundity reduced significantly at 1% level. At low spore load i.e. 10 spores/larva though the fecundity reduced significantly the percentage of hatching, unfertilized and dead eggs was insignificant even at 5% level compared to control.

Testing of larvae hatched out and also dead embryo inside the eggs of the batches infected with high spore load (10^5 spores/larva) revealed 100 % pebrine infection. However, the rate of disease transmission to the progeny was 4.57 % in the larvae hatched and 28.44 % in the embryo died in the batches fed with 10 spores/larva. This indicates that not all the eggs of an infected female are pebrinised in lower spore loads, and the rate of pebrinization depends on the initial infection load administered during larval stage (Table I). In addition, it is not possible to differentiate between the infected and uninfected layings visually when the spore load is very low and hence thorough microscopic examination of eggs is essential.

ii. IF × UM cross:

Infected female crossed with uninfected male (IF × UM) also showed reduced fecundity and high percentage of unfertilized eggs (Table II). The percentage of hatched eggs was lowest (54.97 %) in 10^5 spore/larva-infected batches. The hatchability was significantly lower in infected batches as in IF × IM cross from spore load 10^5 to 10^2 spores/larva compared to uninfected control. Fecundity was significantly low in 10 spores/larva-infected batch compared to uninfected control but there was no significant difference in the hatchability (95.47 %) percentage of fertilized eggs and dead eggs.

Testing of larvae hatched out from infected batches and also those embryos that died within the egg showed pebrine infection; however the infection rate varied depending on the intensity of infection in the parent. The percentage of pebrinised eggs was 100 % in the batch infected with 10^5 spores/larvae while it was 6.30 % in the larvae fed with 10 spores/larva (Table II). This indicates that not all the eggs are infected when the mother moth is infected with low spore load.

Present investigation reveals that the progeny of heavily infected larvae carry 100% infection. Initially it does not show any deleterious effect on the host development but continuous multiplication and deriving nutrient by the parasite from the host results in retarded growth which is evidenced by depletion of host cytoplasmic components. This has a direct effect on the fecundity, development of embryo and subsequently on the hatching as revealed by the ovary sections and egg production.

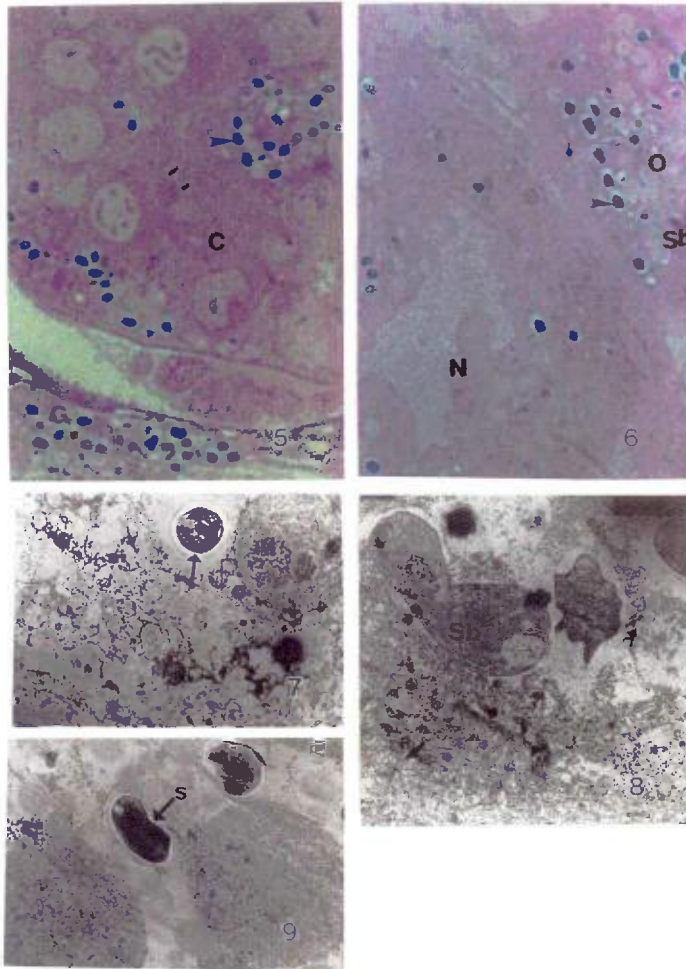


Fig. 5. An enlarged portion of the infected cytochrome (C) and germarium (G) within the pupal ovary. × 1000.

Fig. 5. Agrandissement d'une partie infestée du cytochrome (C) et du germarium (G) à l'intérieur de l'ovaire nymphal. × 1000.

Fig. 6. An enlarged portion of oocyte (O) and nurse cells (NC) showing spore (→) and sporoblast (Sb) stages. × 1000.

Fig. 6. Agrandissement de l'ovocyte (O) et des cellules nourricières (NC) montrant les stades de la spore (→) et du sporoblaste (Sb). × 1000.

Fig. 7. Ultrastructure of the fibrous matrix showing the spore (→) within the ovary. × 14,000.

Fig. 7. Ultrastructure de la matrice fibreuse montrant la spore (→) à l'intérieur de l'ovaire. × 14,000.

Fig. 8. Sporoblast stage of the parasite developing in the oocyte. Enormous mitochondria (M) and ribosomes (R) on one end and depletion of the same at the other. × 14,000.

Fig. 8. Stade du sporoblaste du parasite se développant dans l'ovocyte. Mitochondries (M) et ribosomes (R) énormes à une extrémité et dépérissement des mêmes à l'autre. × 14 000.

Fig. 9. Spore developing in the yolk granules in the egg. S-Spore. × 7000.

Fig. 9. Spore se développant dans les granules du jaune de l'œuf. S-Spore. × 7000.

Table I. Effect of *N. bombycis* infection on seed parameters and disease transmission potential in silkworm *B. mori* - IF × IM cross.**Tableau I. Effet de l'infestation par *N. bombycis* sur les paramètres de la graine et sur le potentiel de transmission de la maladie chez le ver à soie *B. mori* - croisement IF × IM.**

Treatment	Fecundity (No.)	Hatching	Unfertilized	Fertile dead eggs	Hatched Pebrinised eggs	Dead Pebrinised eggs
Traitement	Fécondité (Nb're)	Ecllosion (%)	Non fécondés (%)	Oeufs morts fertiles (%)	Oeufs pébrinisés ayant éclos (%)	Oeufs pébrinisés morts (%)
1×10^5	264.95 ±59.30	52.80 ±8.36	19.48 ±5.49	27.56 ±9.27	100 ± 0.0	100 ± 0.0
1×10^4	362.40 ± 29.87	72.62 ± 6.55	12.73 ± 3.32	14.46 ± 5.98	96.94 ± 5.81	98.37 ± 12.94
1×10^2	398.30 ± 41.82	84.46 ± 4.03	7.58 ± 1.75	7.83 ± 3.13	90.76 ± 9.54	89.11 ±10.25
1×10	483.65 ±18.85	95.85 ± 0.73	2.28 ± 0.47	1.72 ± 0.56	4.57 ± 2.34	28.44 ±10.38
Uninfected <i>Non infesté</i>	517.60 ±11.29	98.08 ± 0.34	1.01 ± 0.20	0.81 ± 0.27	0.00	0.00
F Test	HS	HS	HS	HS	HS	HS
SEM	11.82	1.99	0.98	1.66	1.60	3.69
CD @ 5 %	23.52	3.97	1.95	3.31	3.20	7.35
CD @ 1 %	31.20	5.27	2.58	4.40	4.24	9.75

SEM-Standard error mean / Intervalle de confiance de la moyenne.

CD- Critical difference / Difference between Treatment M1 & Control M2 > CD @ 1% then it is significant / Différence critique entre le Traitement M1 et le témoin M2 > DC à raison de 1 %, alors cela est significatif.

Thus the number of eggs laid is profoundly influenced by pebrine infection and it is a great concern to seed producing centres. The high number of dead embryos and heavily infected hatched larvae observed in the present study indicates that in silkworm though the microsporidian development is arrested after entry into the oocyte, the parasite starts multiplying during the egg incubation period when the embryo develops. Similar interpretations have been made in *Ostranea nubilalis* infected with *N. pyraustae* (Sajap and Lewis, 1988). The action of the microsporidian is reported to be mild in the embryonic condition in muga silkworm (Talukdar, 1995). Similar observations have been made where the embryo in the eggs laid by an infected female revealed maximum number of spores a day or two before hatching but not during the earlier period of egg incubation (Ananthalakshmi *et al.*, 1993). Microscopic examination of the hatched larvae revealed spores in the silk gland and Malpighian tubules (secondary target tissues) on the day of hatching itself indicating that infection spreads to other tissues of the host after embryonic differentiation. It is also suggested that microsporidia remain dormant in the yolk until susceptible organs have developed

during embryogenesis (Kellen and Lindegren, 1973) and the gonadal organs are less susceptible to *N. bombycis* infection than other organs in silkworm. At times even if the oocyte is not infected, the infected yolk granules can be source of contamination to the embryo. Thus, the infection of *N. bombycis* to the reproductive system of its host results not only in transovarian transmission of the parasite but also in substantial destruction of the embryo. Most of the larvae infected through transovarian transmission discharge spores through faecal pellets and subsequently die during 3rd or 4th instar. If these larvae are reared with healthy larvae, the spores discharged from infected larvae forms the source of contamination and this result in spread of pebrine disease during the course of rearing.

Table II. Effect of *N. bombycis* infection on seed parameters and disease transmission potential in silkworm *B. mori* – IF × UM cross

Tableau II. Effet de l'infestation par N. bombycis sur les paramètres de la graine et sur le potentiel de transmission de la maladie chez le ver à soie B. mori – croisement IF × UM.

Treatment	Fecundity (No.)	Hatching	Unfertilized	Fertile dead eggs	Hatched Pebrinised eggs	Dead Pebrinised eggs
Traitement	Fécondité (Nbre)	Eclosion (%)	Non fécondés (%)	Pourcentage d'oeufs morts fertiles (%)	Pourcentage d'oeufs morts ayant éclos atteints par la pébrine (%)	% d'oeufs atteints par la pébrine (%)
1 × 10 ⁵	255.20 ± 30.99	54.97 ± 12.33	19.94 ± 7.08	24.94 ± 5.85	100 ± 0.0	100 ± 0.0
1 × 10 ⁴	332.60 ± 44.23	71.71 ± 6.54	13.44 ± 3.06	14.26 ± 5.04	95.32 ± 7.15	97.70 ± 5.88
1 × 10 ²	421.70 ± 45.93	85.00 ± 3.29	7.48 ± 2.0	7.77 ± 1.83	90.51 ± 6.32	90.65 ± 12.25
1 × 10	462.70 ± 19.61	95.47 ± 0.77	2.47 ± 0.62	1.91 ± 0.55	6.30 ± 3.03	29.42 ± 9.96
Uninfected Non infesté	517.60 ± 11.29	98.08 ± 0.33	1.01 ± 0.20	0.81 ± 0.27	0.00	0.00
F Test	HS	HS	HS	HS	HS	HS
SEM	10.79	2.08	1.16	1.75	1.45	3.83
CD @ 5 %	21.49	4.14	2.31	3.50	2.89	7.62
CD @ 1 %	28.09	5.49	3.06	4.64	3.83	10.11

It is opined that the differences in intensity of infection between colonies are dependent on the intensity of infection in the female parent and this varies within the same colony but sub-lethally infected individuals assure vertical transmission (Nordin, 1975). Significant reduction in fecundity and hatchability in eggs of *Triboleum castaneum* heavily infected with *N. whitei* is reported (Bass

and Armstrong, 1992). In another study the infected male moths do not play any significant destructive role on the fecundity, hatchability and disease transmission to the progeny even at high spore load of 10^5 spores/larva but the infected male moths were found to transfer the spores along with the seminal fluid to the bursa copulatrix of the female moth during mating and the same is not transferred to the progeny (Patil *et al.*, 2002).

The main characteristic of microsporidian infection is its long lasting and even chronic effect on the host. The fecundity is dependent on the reserves of nutritious substances accumulated in the larvae before pupation, as the silk moths do not consume any food (Verber and Jassic, 1961). The microsporidians mainly develop in the fat bodies of the host wherein many metabolic processes occur (Wyatt 1980) and the destruction/depletion of the nutritive reserves due to the infection and multiplication of microsporidians may result in less fecund females (Armstrong and Bass, 1986) besides production of non-sticky and clustered eggs in silkworm (Krishnaswami *et al.*, 1976). The present study reveals that in addition to the spore load administered, the age of the larva and post infection period are also important in pebrine disease transfer from the moth to the progeny.

During the study, the ovary and ovariole were found to harbour almost all stages of the parasite viz., sporont, sporoblast, spores. It appears that the parasite adopts low profile multiplication strategy in the ovary. Otherwise, the continuous multiplication of the parasite in the gonads only leads to severe damage on the gonadal tissues which is detrimental to the host as well as parasite perpetuation.

REFERENCES

- ANANTHALAKSHMI K.V.V., BAIG M., OHTSUKI Y. & DATTA R.K. (1993) Annual Report, CSR&TI, Mysore, India, 101.
- ARMSTRONG E. & BASS L. K. (1986) Effect of infection by *Nosema whitei* on mating frequency and fecundity of *Tribolium castaneum*. J. Invertebr. Pathol., 47: 310-316.
- BASS L. K. & ARMSTRONG E. (1992) *Nosema whitei* effects on oocyte development and maturation in *Tribolium castaneum*. J. Invertebr. Pathol., 59: 115-123.
- BROOKS W. M. (1968) Transovarian transmission of *N. heliothidis* in the corn earworm *Heliothis zea*. J. Invertebr. Pathol., 11:510-512.
- FINE P. E. M. (1984) Vertical transmission of pathogens of invertebrates In Comparative Pathobiology, Cheng, T. C. (Ed.) vol. 7, Plenum, New York, 205-220.
- GRIYAGHEY U. P. & SENGUPTA K. (1989) Studies on the transmission of *Nosema* sp. in tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Sericologia, 29: 383-387.
- HAN M. S. & WATANABE H. (1988) Transovarial transmission of two microsporidians in the silkworm *Bombyx mori* and disease occurrence in the progeny population. J. Invertebr. Pathol., 51:41-45.
- JYOTHI N. B. (2002), Studies on pebrine disease caused by *Nosema bombycis* Naegeli and its effect on the development of the host *Bombyx mori* L. Ph.D. thesis, Bangalore University, Bangalore.
- KELLEN W. R. & LINDEGREN J. E. (1973) Transovarian transmission of *Nosema plodia* in the Indian meal moth *Plodia interpunctella*. J. Invertebr. Pathol., 21:248-254.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M. M., SURYANARYANA S. K. & KAMRAJ S. (1976) Manual on Sericulture: Silkworm rearing, Vol. II FAO Agricultural Services Bulletin, FAO, Rome.
- NORDIN G. L. (1975) Transovarian transmission of a *Nosema* sp. infecting *Malacosoma americanum*. J. Invertebr. Pathol., 25: 221-228
- PATIL C. S., JYOTHI N. B. & DASS C. M. S. (2002) Role of *Nosema bombycis* infected male silk moths in venereal transmission of pebrine disease in *Bombyx mori* L. J. Appl.Entomol., 126, 563-566
- SAJAP A. S. & LEWIS L. C. (1988) Histopathology of transovarial transmission of *Nosema pyraustae* in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. J. Invertebr. Pathol., 52:147-153.
- TALUKDAR J. N. (1995) Symptoms of a microsporidian infection in the muga silkworm, *Antheraea assamensis*. Effect on egg production and hatching. Sericologia, 35: 55-60.

- VERBER J. & JASSIC J. (1961) Microsporidian as a factor in reducing fecundity in insects. *J. Insect Pathol.*, 3: 103-111.
- WAF A. K. & KOTBY F. A. (1971) Histopathological studies of *Nosema bombycis* Naegeli infecting the silkworm, *Bombyx mori*. *Bull. Soc. Entomol. Egypte*, 55: 259-274.
- WYATT G. R. (1980) The fat body as a protein factory. In: *Insect Biology in the Future*, Locke, M. and Smith, D. S. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 201-225.

DEVELOPPEMENT DE *NOSEMA BOMBYCIS* NAEGELI DANS L'OVAIRE, ET IMPACT SUR LA PRODUCTION D'ŒUFS ET SUR LA TRANSMISSION DE LA MALADIE CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

N. B. JYOTHI & C. S. PATIL*

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore –
560 062, Inde. Téléphone : Bureau 091 080-2843 52 21. Personnel – 00 91 080 28 42 58 21.
Email : jyothi_achaiah@yahoo.com

Nosema bombycis, qui provoque la maladie de la pébrine, propage la maladie à la fois horizontalement et verticalement dans les populations de vers à soie. Nous avons étudié l'infestation par *N. bombycis* de l'ovaire du ver à soie, les changements histopathologiques concomitants pendant différents stades de développement de l'ovaire et son effet sur les paramètres de grainage et sur la transmission de la maladie à la descendance. L'infestation de l'ovaire du ver à soie *Bombyx mori* révèle une production énorme de spores dans la couche épithéliale 10 jours après l'infestation (pi). L'infestation se propage à presque tous les tissus de l'ovaire, y compris à la matrice fibreuse, à la gaine germinale, à la gaine de l'ovariole, aux cystocytes pendant le stade larvaire et par la suite aux cellules nourricières et aux ovocytes, pendant le stade nymphal, 16 jours après l'infestation. Après la différenciation de l'ovaire dans les compartiments de l'œuf, on observe aussi les stades de développement du parasite dans l'épithélium folliculaire, dans les granules du vitellus et dans le pédoncule interfolliculaire. Bien que l'ovaire contienne tous les stades végétatifs et de la spore de *N. bombycis*, le taux de multiplication et de production des spores, est faible par comparaison aux autres organes du même hôte. La diminution de la composante cytoplasmique de l'hôte et la lyse des composants cellulaires autour de la spore est une caractéristique commune. La fécondité, la capacité d'éclosion et la population malade dans la descendance à la fois d'une femelle infestée croisée avec un mâle infesté ou avec un mâle non infesté, dépendent de la charge en spores administrée pendant le stade larvaire à la femelle.

INTRODUCTION

La maladie de la pébrine provoquée par *Nosema bombycis* est une maladie sévère du ver à soie *Bombyx mori*, en raison de la prédominance du mode de transmission transovarier du pathogène. Si des larves saines se nourrissent pendant le dernier âge (IV et V) sur des feuilles de mûrier contaminées, ces larves filent des cocons et émergent normalement, mais déposent des œufs infestés de manière transovarienne (Han et Watanabe, 1988). Le taux de transmission de la maladie de la pébrine et le degré d'infestation de la descendance est directement lié à l'intensité de l'infestation chez le papillon mère (Griyaghey et Sengupta, 1989 ; Talukdar, 1995).

Bien qu'on ait rapporté l'impact du développement du microsporidien y compris de ses stades dans les gonades des insectes chez de nombreux lépidoptères (Fine, 1984), il existe des opinions variées sur les différents stades de développement du parasite et sur les zones des gonades, qui les abritent. On a observé les stades schizogoniques de *N. heliothidis* dans les cellules nourricières et

* Auteur auquel adresser la correspondance.

dans les ovocytes des ovarioles de *Heliothis zea*, mais pas de spores (Brooks, 1968). *N. bombycis* est abrité dans la gaine et dans les granules du jaune d'œuf chez le papillon femelle du ver à soie (Wafa et Kotby, 1971).

Dans le cas du ver à soie, bien qu'il existe beaucoup de documents sur l'existence d'une transmission verticale de *N. bombycis*, on n'a pas bien compris le schéma spécifique de l'infestation dans l'ovaire et par la suite dans les œufs. Cette étude concerne l'infestation de *N. bombycis* et les changements histopathologiques concomitants à différents stades de développement de l'ovaire du ver à soie, son implication sur la production de graines et sur la transmission transovarienne chez le ver à soie.

MATERIEL ET METHODES

Histopathologie :

On infeste les vers à soie de la race bivoltine, NB4D2, de manière individuelle *per os* avec 10^6 spores / larve, le 1^{er} jour du 3^{ème} âge (Lot I) et le 1^{er} jour du 5^{ème} âge (Lot II). On procède à un nourrissage infectieux une fois et, par la suite, on donne quotidiennement de la feuille lavée à l'eau distillée pour éviter la contamination secondaire. On dissèque les vers à soie du lot I, le 1^{er} jour du 5^{ème} âge (10 jours après l'infestation), le 6^{ème} jour du 5^{ème} âge (15 jours après l'infestation) et les nymphes du lot II le 8^{ème} jour (16 jours après l'infestation). On dissèque l'ovaire, on le fixe dans du fixatif de Karnovsky, on le post fixe dans du tétrahydroxyde d'osmium et on l'inclut dans de l'Epon-Araldite (Jyothi, 2002). On réalise des coupes semi-fines de 0,80 µm en utilisant un microtome Reichert Jung Ultra (Allemagne), on les colore avec du violet de méthyle à 2 %, on évalue la présence de spores sous un microscope optique et on prend des photographies. On réalise des coupes ultra fines de 80 nm, on les colore avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb et on les observe sous un microscope à transmission électronique (Marque : Jeol CX II-100, Japon).

Effet de l'infestation par *N. bombycis* sur les paramètres de grainage :

On dilue la charge en spores de 10^7 spores / ml de manière successive jusqu'à 10^3 spores / ml. On infeste les larves de ver à soie de la race bivoltine NB4D2 *per os* le 1^{er} jour du cinquième âge, en nourrissant des larves individuelles avec des morceaux de feuille de mûrier de 3 cm² enduites avec 0,01 ml de suspension de spores de pébrine. On maintient les lots nourris avec 10^5 spores / larve à 10 spores / larve. On maintient séparément un lot témoin non infesté. Le jour du filage, on monte les vers sur une chandrika (encabanage) pour le coconnage. On procède au sexage des nymphes le 8^{ème} jour de la nymphose, et on les maintient séparément. Après l'émergence des papillons, on les laisse s'accoupler, selon les combinaisons suivantes, avec chaque charge en spores :

IF × IM, IF × UM et UF × UM (Témoin)

Où IF signifie Femelle infestée, IM - Mâle infesté, UF - Femelle non infestée et UM - Mâle non infesté.

Après la copulation pendant 5 à 6 h, on laisse les papillons femelles pondre des œufs pendant 24 h, puis on teste le papillon mère pour confirmer l'infestation. Après l'éclosion, on teste les vers individuellement, sous un microscope optique, par rapport à la maladie de la pébrine en écrasant le ver avec une lame couvre-objet dans une goutte de KOH à 2 %. On calcule le pourcentage d'infestation de chaque croisement. On enregistre le nombre d'œufs ayant éclos, morts et non fécondés par carton de ponte. On soumet les données à l'analyse de variance (ANOVA). Pour chaque charge en spores (traitement), on maintient 10 couples de papillons et on répète l'expérience trois fois.

RESULTATS ET DISCUSSION

Effet de l'infestation par *N. bombycis* sur l'ovaire :

Chez les larves infestées, les ovaires présentent des pustules blanches, quand on les observe *in toto* 15 jours après l'infestation. La coupe longitudinale de l'ovaire au bout de 10 jours après l'infestation, révèle une énorme production de parasites dans la gaine péritonéale à double couche (couche épithéliale). L'infestation dans la gaine péritonéale de l'ovaire est plus intense par comparaison à celle dans les cellules souches (Fig. 1). Les follicules allongés deviennent tubulaires et se différencient en 4 ovarioles ou tubules ovariens à partir de chaque ovaire au bout du 6^{ème} jour du 5^{ème} âge.

A ce stade, c'est-à-dire 15 jours après l'infestation, en plus des couches épithéliales, on constate que le parasite attaque la matrice fibreuse (Fig. 2 et 7), les cellules germinales, la gaine de l'ovariole et les cystocytes (Fig. 2 et 5). Les observations 5 à 6 jours après la nymphose (16 jours après l'infestation) révèlent le développement du parasite et ses stades à la fois dans les cellules nourricières et dans les ovocytes (Figs. 3 et 6). Par ailleurs, avec la différenciation de l'œuf dans des compartiments individuels, on observe le parasite pendant divers stades de développement dans l'épithélium folliculaire, dans les granules du jaune et dans le pédoncule interfolliculaire (Figs. 4 et 9). Bien que l'œuf contienne tous les stades végétatifs et de la spore du parasite *N. bombycis*, le taux de multiplication et de production de spores est moins important que dans d'autres tissus du même hôte. Cependant, la diminution des composants cytoplasmiques de l'hôte et la lyse des composants cellulaires, comme les ribosomes et les mitochondries autour de la spore, sont des caractéristiques courantes (Figs. 7 à 9). Les cellules germinales sont sévèrement infestées chez les individus atteints par une infestation très importante et lorsque la période après l'infestation dure plus longtemps.

Effet de l'infestation par *N. bombycis* sur les paramètres de grainage du ver à soie et sur la transmission de la maladie :

i. Croisement IF × IM :

La fécondité diminue significativement chez les lots où les papillons mâles et femelles sont à la fois infestés par la pébrine et croisés. On enregistre une faible fécondité (264,20) et un faible pourcentage d'éclosion (52,80 %) chez le lot infesté par 10⁵ spores / larve, par comparaison au témoin non infesté, puisqu'il est aussi importants que 483,65 et 95,85 % respectivement chez les lots infestés avec 10 spores / larve (Tableau I). La diminution de l'administration de la charge en spores pendant la période larvaire augmente la fécondité. Même entre les traitements, la fécondité diminue de manière significative au seuil de 1 %. Avec une faible charge en spores, c'est-à-dire 10 spores / larve, bien que la fécondité diminue significativement, le pourcentage d'éclosion, d'œufs non fécondés et morts est insignifiant, même au seuil de 5 %, par comparaison au témoin.

Lorsqu'on teste les larves qui ont éclos, ainsi que les embryons morts à l'intérieur des œufs qui proviennent de lots infestés avec une charge élevée en spores (10⁵ spores / larve), on constate 100 % d'infestation par la pébrine. Cependant, chez ceux nourris avec 10 spores / larve, le taux de transmission de la maladie à la descendance est de 4,57 % chez les larves écloses et de 28,44 % chez les œufs dont l'embryon est mort. Cela indique qu'avec de plus faibles charges en spores, tous les œufs d'une femelle infestée ne sont pas pébrinisés, et le taux de pébrinisation dépend de la charge d'infestation initiale administrée pendant le stade larvaire (Tableau I). De plus, il n'est pas possible de faire la différence entre les pontes infestées et non infestées, de manière visuelle, quand la charge en spores est très faible et il est donc essentiel de procéder à un examen microscopique approfondi des œufs.

ii. Croisement IF × UM :

Une femelle infestée croisée avec un mâle non infesté (IF × UM) présente aussi une diminution de la fécondité et un pourcentage élevé d'œufs non fécondés (Tableau II). Le pourcentage d'œufs

ayant éclos est plus faible (54,97 %) chez les lots infestés par 10^5 spores / larve. La capacité d'éclosion est significativement plus faible chez les lots infestés, avec une charge en spores de 10^5 à 10^2 spores / larve, comme chez le croisement IF $\times$ IM, par comparaison au témoin non infesté. La fécondité est significativement faible chez le lot infesté à raison de 10 spores / larve, par comparaison au témoin non infesté, mais il n'y a pas de différence significative concernant le pourcentage d'éclosion (95,47 %) des œufs fécondés et morts.

Lorsqu'on évalue les larves ayant éclos à partir de lots infestés et les embryons qui meurent à l'intérieur de l'œuf, on observe une infestation par la pébrine ; cependant, le taux d'infestation varie en fonction de l'intensité de l'infestation chez le parent. Le pourcentage d'œufs atteints par la pébrine est de 100 % chez le lot infesté avec 10^5 spores / larve, tandis qu'il est de 6,30 %, chez les larves nourries avec 10 spores / larve (Tableau II). Cela indique que tous les œufs ne sont pas infestés, quand le papillon femelle est infesté par une faible charge en spores.

L'étude actuelle révèle que la descendance des larves très infestées est porteuse de 100 % d'infestation. Au début, cela n'entraîne pas d'effet négatif sur le développement de l'hôte, mais une multiplication continue et le fait que le parasite tire des nutriments de l'hôte entraîne le retardement de la croissance, comme le montre la diminution des composants cytoplasmiques de l'hôte. Cela a un effet direct sur la fécondité, sur le développement de l'embryon et par la suite sur l'éclosion, comme le révèlent les coupes des ovaires et la production d'œufs.

Le nombre d'œufs est donc profondément influencé par l'infestation par la pébrine et cela inquiète beaucoup les centres de production de graines. Le nombre élevé d'embryons morts et de larves très infestées observés dans cette étude indique que, chez le ver à soie, bien que le développement du microsporidien soit arrêté après l'entrée dans l'ovocyte, le parasite commence à se multiplier pendant la période d'incubation de l'œuf, quand l'embryon se développe. Des interprétations similaires ont été faites chez *Ostranea nubilalis* infesté par *N. pyraustae* (Sajap et Lewis, 1988). On a rapporté que l'action du microsporidien est modérée dans l'embryon chez le ver à soie muga (Talukdar, 1995). Des observations similaires ont été faites sur l'embryon d'œufs pondus par une femelle infestée ; elles révèlent un nombre maximum de spores un jour ou deux avant l'éclosion, mais pas pendant la période précoce d'incubation des œufs (Ananthalakshmi et coll., 1993). L'examen au microscope des larves écloses révèle des spores dans la glande séricigène et dans les tubes de Malpighi (tissus cible secondaires) le jour de l'éclosion lui-même, ce qui indique que l'infestation se propage aux autres tissus de l'hôte après la différenciation embryonnaire. On a aussi suggéré que les microsporidies restent au repos dans le vitellus, jusqu'à ce que les organes sensibles se développent pendant l'embryogenèse (Kellen et Lindegren, 1973) et les organes gonadiques sont moins sensibles à l'infestation par *N. bombycis* que les autres organes chez le ver à soie. Parfois, même si l'ovocyte n'est pas infesté, les granules de vitellus infestés peuvent être la source de la contamination dans l'embryon. L'infestation du système reproductif de l'hôte par *N. bombycis* entraîne donc non seulement la transmission transovarienne du parasite, mais aussi une destruction importante de l'embryon. La plupart des larves infestées par transmission transovarienne déchargent des spores par les pétoles fécales et par la suite, elles meurent au cours du 3^{ème} ou du 4^{ème} âge. Si on élève ces larves avec des larves saines, les spores déchargées par les larves infestées forment la source de la contamination et cela entraîne la propagation de la maladie de la pébrine au cours de l'élevage.

On pense que les différences d'intensité de l'infestation entre les colonies dépendent de l'intensité de l'infestation du parent femelle et cela varie à l'intérieur de la même colonie, mais les individus infestés semiléthalement assurent la transmission verticale (Nordin, 1975). On a rapporté une diminution significative de la fécondité et de la capacité d'éclosion chez les œufs de *Triboleum castaneum*, très infestés par *N. whitei* (Bass et Armstrong, 1992). Dans une autre étude, les papillons mâles infestés ne jouent pas un rôle destructeur significatif sur la fécondité, la capacité d'éclosion et la transmission de la maladie à la descendance, même avec une charge élevée en spores de 10^2 spores / larve, mais les papillons mâles infestés s'avèrent transférer les spores avec le fluide séminal aux

bourses copulatrices du papillon femelle pendant l'accouplement et cela n'est pas transmis à la descendance (Patil et coll., 2002).

La principale caractéristique de l'infestation microsporidienne est son effet durable et même chronique sur l'hôte. La fécondité dépend des réserves en substances nutritives accumulées dans les larves avant la nymphose, puisque les papillons ne consomment pas de nourriture (Verber et Jassic, 1961). Les microsporidiens se développent principalement dans le corps gras de l'hôte où de nombreux processus métaboliques se produisent (Wyatt, 1980) et la destruction / l'épuisement des réserves nutritives à cause de l'infestation et de la multiplication des microsporidiens pourrait entraîner une fécondité moins importante des femelles (Armstrong et Bass, 1986) ainsi que la production d'œufs qui ne collent pas et d'œufs agglomérés chez le ver à soie (Krishnaswami et coll., 1976). Cette étude révèle qu'en plus de la charge en spores administrée, l'âge de la larve et la durée de la période après l'infestation sont aussi importants dans le transfert de la maladie de la pébrine du papillon à la descendance.

Dans cette étude, on constate que l'ovaire et l'ovariole abritent presque tous les stades du parasite, c'est-à-dire le sporonte, le sporoblaste, les spores. On observe que le parasite adopte une stratégie de multiplication à profil bas dans l'ovaire. Par ailleurs, la multiplication continue du parasite dans les gonades n'entraîne des dégâts sévères que dans les tissus gonadiques, ce qui est préjudiciable à l'hôte ainsi qu'à la perpétuation du parasite.

TOXICITIES OF SECONDARY METABOLITES PRODUCED BY PATHOGENS OF *MYROTHECIUM* LEAF SPOT OF MULBERRY DISEASES (*MYROTHECIUM RORIDUM* AND *M. VERRUCARIA*)

R. MURAKAMI, S. HAYASAKA, S. WADA, K. TATEISHI, T. ARAKAWA,
K. MIYAMOTO & W. MITSUHASHI

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

Myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J are secondary metabolites produced by Myrothecium roridum and M. verrucaria which are pathogens causing Myrothecium leaf spot disease of mulberry. These metabolites showed toxicities including antimicrobial activities against three species of gram positive bacteria, five species of yeasts, 18 species of fungi and one microsporidium; phytotoxic activities against 16 species of plant belonging to 11 families and insecticidal activities against six species of insects, but did not show toxicities against 12 species of gram negative bacteria and M. roridum and M. verrucaria.

Keywords: *Myrothecium roridum*, *Myrothecium verrucaria*, toxicity, trichothecenes.

INTRODUCTION

Myrothecium leaf spot disease of mulberry was reported in Japan, and pathogens causing it were identified as *Myrothecium roridum* (Takahashi *et al.*, 1994) and *M. verrucaria* (Murakami *et al.*, 2005). Myrotoxin B is produced by *M. roridum* (Murakami, *et al.*, 1999), and roridin A and verrucarins A and J are produced by *M. verrucaria* (Murakami *et al.*, 2006). Myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J belong to trichothecenes. Trichothecenes are produced by some species belonging to the genera of *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrytis*, *Trichoderma*, *Trichothecium* and *Verticimonosporium* as secondary metabolites. Trichothecenes show toxicities against eukaryotes because they inhibit protein synthesis in eukaryotic cells (Cundliffe and Davis, 1977; Ehrlich and Daigle, 1987), and there are many reports on toxicities of trichothecenes which have a wide range of biological activities including insecticidal (Kishaba *et al.*, 1962), antifungal, antibacterial (Nespiak *et al.*, 1961), phytotoxic (Bamburg and Strong, 1971; Cutler and Jarvis, 1985) and cytotoxic activities (Schiefer *et al.*, 1989). More than 170 trichothecenes have been reported until 1991 (Grove, 1991), and it is known that their toxicities differ according to their chemical structures (Bamburg and Strong, 1971). However, examinations of trichothecenes toxicities are limited because of insufficient amount of isolated trichothecenes (Schiefer *et al.*, 1989; Ueno, 1983).

So far, we have isolated myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J produced by these pathogens in order to examine their toxicity. In this paper, we examined antimicrobial, phytotoxic, insecticidal activities of the four above-mentioned trichothecenes against some microorganisms, plants and insects.

MATERIALS AND METHODS

Trichothecenes:

Pathogens causing *Myrothecium* leaf spot of mulberry (*M. roridum* strain M9403 and *M. verrucaria* strain M9583) were cultured on potato sucrose agar medium (PSA: 2% sucrose and 1.8% agar in 20% potato broth) at 25 °C for one month. Myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J were isolated from the medium extracts using high performance liquid chromatography (Murakami *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2006).

Microorganisms test:

Six species of gram positive bacteria, 11 species of gram negative bacteria, five species of yeasts, 20 species of fungi and one protozoa were used (Table I). All tests were replicated three times.

Bacterium and yeast tests:

10^6 cfu (colony formation unit) /ml of each bacterium and each yeast were mixed with Wakimoto's semi-synthetic medium (0.5% peptone, 1.5% sucrose, 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.5% agar in 30% potato broth), and then the media were dug by cork borer (6 mm in diam.). Then 10 μl of 2×10^{-7} M of the myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J were put in the hole, and the inocula were incubated at 25 °C for two days. We judged that used trichothecenes showed toxicities against tested bacteria and yeasts when inhibition zones appeared around the hole.

Fungus tests:

Ten micro liters of 2×10^{-7} M of each trichothecene were put on each fungus hypha (5×5 mm) on PSA and the inocula were incubated at 25 °C. We judged that antifungal activities were positive when the diameter of formed colony of fungus applied with trichothecene was smaller than it applied with distilled sterilized water (DSW).

Microsporidian test:

Spores of *Nosema bombycis* were immersed in 2×10^{-7} M of myrotoxin B at 25 °C for 30 min and then washed with DSW. The washed spores were treated with 0.1 M potassium chloride containing 3% of hydrogen peroxide. The rate of germinated spores was calculated. We judged that antimicrosporidian activity by myrotoxin B was positive when the germination rate of the spores applied with myrotoxin B was lower than it of spores applied with DSW.

Plant tests:

Herbicidal test:

16 species of plants belonging to 11 families (Table II) were grown at 25 ± 2 °C in green house, and their leaves and stems were applied with 2×10^{-7} M of myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J. Three plants were used for each test and were checked at three, seven and ten days after the application.

Germination test:

Filter paper was soaked in 2×10^{-7} M to 2×10^{-13} M of each trichothecene. More than 10 seeds of *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Oenothera speciosa* and *Setaria italica* were put on the paper and then incubated at 25 °C. The number of germinated seeds was counted within 10 days after the application. As control, seeds of the four species were put on paper soaked in DSW, and then their rates of germination were calculated. The average inhibition rate of germination (IRG = rate of not germinated seeds applied with trichothecene / germination rate of control) of three replications was calculated.

Insect tests:

Peroral inoculations with myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J were performed. Twenty individuals of *Agrotis segetum*, *Bombyx mori*, *Hyphantria cunea*, *Mamestra brassicae* and *Spodoptera litura* and 10 individuals *Psacotheta hilaris* (third stage larvae) were fed on artificial food (Shirukumeito R, Nihon Nosan Kogyo K.K., Yokohama) with 2×10^{-7} M to 2×10^{-12} M of each trichothecene, and they were kept until their pupation at 25 °C. Number of dead insects was counted, and average mortality of each insect (= number of dead insects / number of tested insects) of three replications was calculated. As control, larvae of the six species were fed on diet with DSW.

Statistical analysis:

Value of IRG and mortality were arc-sine transformed prior to statistical analysis. The data were subjected to analysis of two-way factorial ANOVA and Scheffe post-hoc test by StatView 4.0 software.

RESULTS

Antimicrobial activities:

We judged that myrotoxin B and roridin A and verrucarins A and J showed antibacterial activities against *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis* and *Curtobacterium flaccumfaciens* because of appearance of an inhibition zone around the hole treated with 2×10^{-7} M of each trichothecene, clearly (Table 1). With regard to yeast tests, a clear inhibition zone appeared around the hole treated with 2×10^{-7} M of each trichothecene. Therefore, we judged that each trichothecene showed toxicities against tested yeasts. In the fungus tests without *M. roridum* and *M. verrucaria*, the diameter of colonies applied with 2×10^{-7} M of each trichothecene was smaller than it of colonies applied with DSW (Fig. 1). In the *M. roridum* and *M. verrucaria* tests, the diameter of colonies applied with each trichothecene was the same size as that of them applied with DSW. Therefore, we judged that each trichothecene showed antifungal activities against tested fungi without *M. roridum* and *M. verrucaria*. Germination rate of spores of *N. bombycis* applied with DSW was 89.5 %, while 88.8 % and 84.8 % of spores applied with 2×10^{-11} M and 2×10^{-7} M of myrotoxin B germinated, respectively. Thus, we judged that myrotoxin B showed antimicrosporidian activity against *N. bombycis*.

Phytotoxic activities:

Herbicidal activities:

Colour of leaves of all plants applied with 2×10^{-7} M of each trichothecene was browned or yellowed at seven days after the application (Fig. 2). Therefore, we judged that 2×10^{-7} M of myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J showed herbicidal activities against the tested plants. *Amaranthus blitum*, *A. lividus*, *Arabidopsis thaliana*, *Eclipta prostrata*, *Oenothera speciosa*, *Nicotiana benthamiana* and *Persicaria thunbergii* seemed to be more sensitive than the other tested plants by the application. These damaged leaves fell down and then new leaves emerged.

Inhibition of germination:

At control, germination rates of the four tested species were 98-100%. IRG of each plant was affected by each concentration of each trichothecene ($p < 0.007$ at ANOVA in Fig.3). Therefore, we consider that each trichothecene inhibits germination of the tested plants. IRG of 2×10^{-13} M of each trichothecene was 0% but lengths of stem and root of the seedlings were shorter than them of seedlings applied with DSW. There were significant differences between IGR of *N. benthamiana* and IGR of *A. thaliana* ($p = 0.009$ at Scheffe test), between IGR of *N. benthamiana* and IGR of *O. speciosa* ($p = 0.04$) and between IGR of *N. benthamiana* and IGR of *S. italica* ($p < 0.0001$) in myrotoxin B test. Thus, we consider that *N. benthamiana* is the most sensitive to application with myrotoxin B among the tested plants.

Table I. Toxicities of myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J for micro-organisms.
Tableau I. Toxicités de la myrotoxine B, de la roridine A et des verrucarines A et J pour les micro-organismes.

Microorganisms	MB ^{a)}	RA	VA	VJ	Microorganisms	MB	RA	VA	VJ
<Bacterium / Bactéries>					<Fungi / Champignons>				
(Gram positive)					(Zygomycetes)				
<i>Bacillus subtilis</i>	+ ^{b)}	+	+	+	<i>Rhizopus oryzae</i>	+	+	+	+
<i>Clavibacter michiganensis</i>	+	+	+	+	(Ascomycetes)				
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> MAFF301198	+	+	+	+	<i>Bipolaris oryzae</i>	+	+	+	+
<i>Kocuria varians</i> MAFF117201	-	-	-	-	<i>Rosellinia necatrix</i>	+	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MAFF117201	-	-	-	-	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> MAFF118078	-	-	-	-	(Basidiomycetes)				
(Gram negative)					<i>Flammulina velutipes</i>	+	+	+	+
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	-	-	<i>Pleurotus ostreatus</i>	+	+	+	+
<i>Azorhizobium caulinodans</i> MAFF219459	-	-	-	-	<i>Ustilago scitaminea</i> MAFF305691	+	+	+	+
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> MAFF106101	-	-	-	-	<i>Ustilago zeae</i> MFF236374	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MAFF519002	-	-	-	-	(Imperfecti)				
<i>Ochrobactrum anthropi</i> MAFF520011	-	-	-	-	<i>Beauveria bassiana</i>	+	+	+	+
<i>Pseudomonas cichorii</i>	-	-	-	-	<i>Beauveria brongniartii</i>	+	+	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-	-	-	<i>Botrytis cinerea</i>	+	+	+	+
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	-	-	-	-	<i>Colletotrichum acutatum</i>	+	+	+	+
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	-	-	-	-	<i>Colletotrichum dematium</i>	+	+	+	+
<i>Salmonella agona</i> MAFF910335	-	-	-	-	<i>Fusarium solani</i>	+	+	+	+
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	-	-	-	<i>Metharizium anisopliae</i>	+	+	+	+
<Yeast / Levure>					<i>Myrothecium roridum</i>	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i> MAFF114085	+	+	+	+	<i>Myrothecium verrucaria</i>	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> MAFF113836	+	+	+	+	<i>Paecilomyces farinosus</i>	+	+	+	+
<i>Kleocera apiculata</i> MAFF114302	+	+	+	+	<i>Pestalotia</i> sp.	+	+	+	+
<i>Pichia anomala</i> MAFF114302	+	+	+	+	<i>Phoma</i> sp.	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MAFF113013	+	+	+	+	<Microsporidium / Microsporidien>				
					<i>Nosema bombycis</i>	+			

Some bacteria, yeasts and fungi were given from MAFF gene bank (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan). Ten micro liters of 2×10^{-7} M of myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J were put on the microorganisms incubated on potato sucrose agar medium.

a) MB: myrotoxin B, RA: roridin A, VA: verrucarins A, VJ: verrucarins J.

b) + : where this symbol is reported for bacteria and yeasts, an inhibition zone appeared ; for fungi, the diameter of the colony, where the metabolites were applied, was reduced in size in comparison to the non-applied colony ; for protozoa, germination of it was inhibited.

- : where this symbol is reported, no inhibition was observed.

La Banque Génétique du MAFF (Ministère de l'Agriculture, des Forêts et de la Pêche) a donné des bactéries, levures et champignons. On place dix microlitres de 2×10^{-7} de myrotoxine B, de roridine A et des verrucarines A et J sur les micro-organismes incubés sur le milieu agar - saccharose - pomme de terre.

a) MB : myrotoxine B, RA : roridine A, VA : verrucarine A, VJ : verrucarine J.

b) + : là où ce symbole apparaît pour les bactéries et les levures, une zone d'inhibition apparaît ; pour les champignons, le diamètre de la colonie où on applique les métabolites diminue de taille par comparaison à l'endroit où il n'y a pas de colonie ; pour les protozoaires, leur germination est inhibée.

- : là où ce symbole apparaît, on n'observe pas d'inhibition.

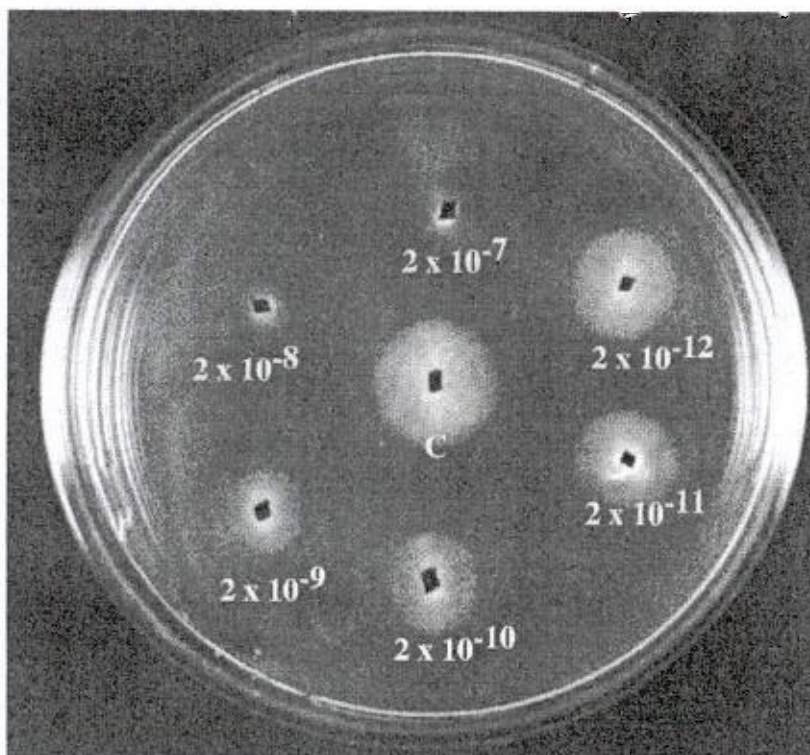


Fig 1. Antifungal activity of myrotoxin B against *Colletotrichum dematium*. Ten micro liters of 2×10^{-7} M to 2×10^{-12} M of myrotoxin B were applied on hyphal blocks. The center of hyphal block was applied with 10 μ l of distilled sterilized water (C).

Fig. 1. Activité antifongique de la myrotoxine B contre Colletotrichum dematium. On applique dix micro litres de 2×10^{-7} M   2×10^{-12} M de myrotoxine B sur les blocs hyphaux. On applique 10 μ l d'eau distillée stérilisée au centre du bloc hyphal (C).

Insecticidal activities:

At control, mortalities of the six tested species were 0% because all larvae pupated. Mortality of each insect was affected by concentration of each trichothecene ($0.02 < p < 0.03$ at ANOVA in Fig. 4) and not affected by kinds of tested trichothecenes. We consider that *B. mori* is the most sensitive to application with each trichothecene among the tested insects because there were significant differences between mortality of *B. mori* and mortality of other insects ($p < 0.002$ at Scheffe test). All *B. mori* fed on the artificial food containing 2×10^{-7} M of trichothecenes died within an hour after the treatments, and all *B. mori* fed on diet with 2×10^{-8} M of the trichothecenes died within a day. Growth of survived *B. mori* fed on diet with 2×10^{-9} M of the four trichothecenes (survival rate: 56.7% for myrotoxin B, 13.3% for roridin A, 26.7% for verrucaridin A, 6.7% for verrucaridin J) and growth of *B. mori* fed on with 2×10^{-10} M of each trichothecene were arrested (Fig. 5) and the larvae did not

pupate. Dead larvae of *A. segetum* fed on diet with 2×10^{-7} M of myrotoxin B and *H. cunea* fed on diet with 2×10^{-7} M to 2×10^{-8} M of myrotoxin B were found, and all *M. brassicae* fed on diet with 2×10^{-7} M of roridin A and verrucarins A and J died. Length of body and weight of survived larvae of *A. segetum*, *H. cunea* and *M. brassicae* fed on each trichothecene were lower than those of larvae fed on diet without trichothecene and their growth was arrested. *S. litura* and *P. hilaris* did not die in these tests but growth of larvae fed on each trichothecene was arrested. As results, we consider that each trichothecene showed insecticidal activities against tested insects.

Table II. Tested plants used for examination of toxicities of myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J.

Tableau II. Plantes testées utilisées pour l'examen des toxicités de la myrotoxine B, de la roridine A et des verrucarines A et J.

<Amaranthaceae>	<Gramineae>
<i>Amaranthus blitum</i>	<i>Alopecurus pratensis</i>
<i>Amaranthus lividus</i>	<i>Digitaria violascens</i>
<Brassicaceae>	<u><i>Setaria italica</i></u>
<u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	<Malvaceae>
<Chenopodiaceae>	<i>Abutilon theophrasti</i>
<i>Chenopodium album</i>	<Polygonaceae>
<Compositae>	<i>Persicaria thunbergii</i>
<i>Eclipta prostrata</i>	<i>Polygonum hydropiper</i>
<Convolvulaceae>	<Onagraceae>
<i>Ipomoea purpurea</i>	<u><i>Oenothera speciosa</i></u>
<Cyperaceae>	<Solanaceae>
<i>Cyperus microiria</i>	<u><i>Nicotiana benthamiana</i></u>
<i>Cyperus nipponicus</i>	

Underlined plants were used also for examination of inhibition of the four trichothecenes for germination.
Les plantes soulignées sont aussi utilisées pour l'examen de l'inhibition des quatre trichothécènes lors de la germination.



Fig. 2. Plants applied with 2×10^{-7} M of myrotoxin B at seven days after the application.

1, 3: arrows show that tops of stem of *Amaranthus blitum* (1) and *Digitaria violascens* (3) are yellowed and wilted by the application. 2, 4: arrows show that leaves of *A. lividus* (2) and *Eclipta prostrata* (4) are browned and wilted by the application. 5: arrow shows that leaf of *Abutilon theophrasti* is yellowed by the application.

Fig 2. Plantes auxquelles on a appliqué 2×10^{-7} M de myrotoxine B, sept jours après l'application.

1, 3 : Les flèches montrent que les extrémités de la tige d'*Amaranthus blitum* (1) et de *Digitaria violascens* (3) jaunissent et flétrissent après l'application. 2, 4 : les flèches montrent que les feuilles d'*A. lividus* (2) et d'*Eclipta prostrata* (4) brunissent et flétrissent après l'application. 5 : la flèche montre que la feuille d'*Abutilon theophrasti* jaunit avec l'application.

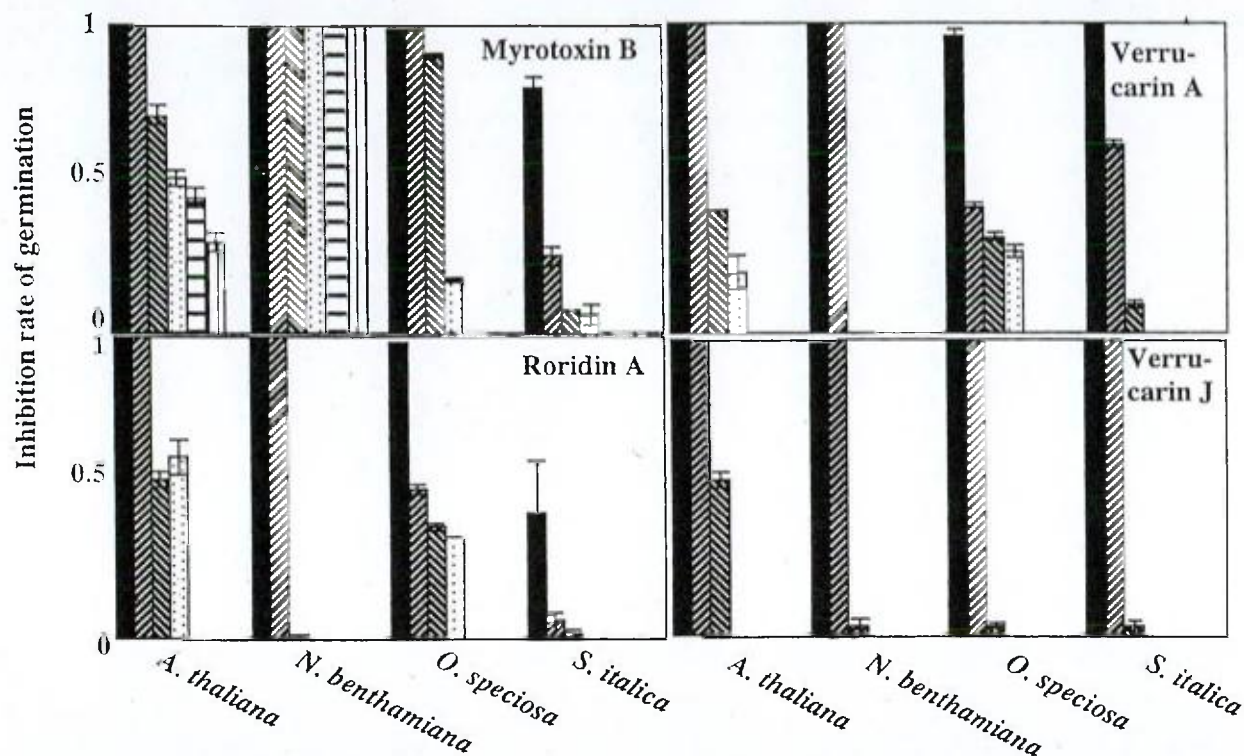


Fig. 3. Inhibition of germination of *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Oenothera speciosa* and *Setaria italica* applied with 2×10^{-7} M to 2×10^{-13} M of myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J. Seeds of the plants were applied with

■ : 2×10^{-7} M, ▨ : 2×10^{-8} M, ▩ : 2×10^{-9} M, ░ : 2×10^{-10} M, ▬ : 2×10^{-11} M, ▮ : 2×10^{-12} M and □ : 2×10^{-13} M of each trichothecene.

Fig. 3. Inhibition de la germination d'*Arabidopsis thaliana*, de *Nicotiana benthamiana*, d'*Oenothera speciosa* et de *Setaria italica* auxquelles on a appliqué de 2×10^{-7} M à 2×10^{-13} M de myrotoxine B, de roridine A et de verrucarines A et J.

On applique aux graines 2×10^{-7} , 2×10^{-8} , 2×10^{-9} , 2×10^{-10} M, 2×10^{-11} M, 2×10^{-12} M et 2×10^{-13} M de chacun des trichothécènes. Bars show standard errors of three replications. / Les barres montrent les intervalles de confiance des trois répétitions.

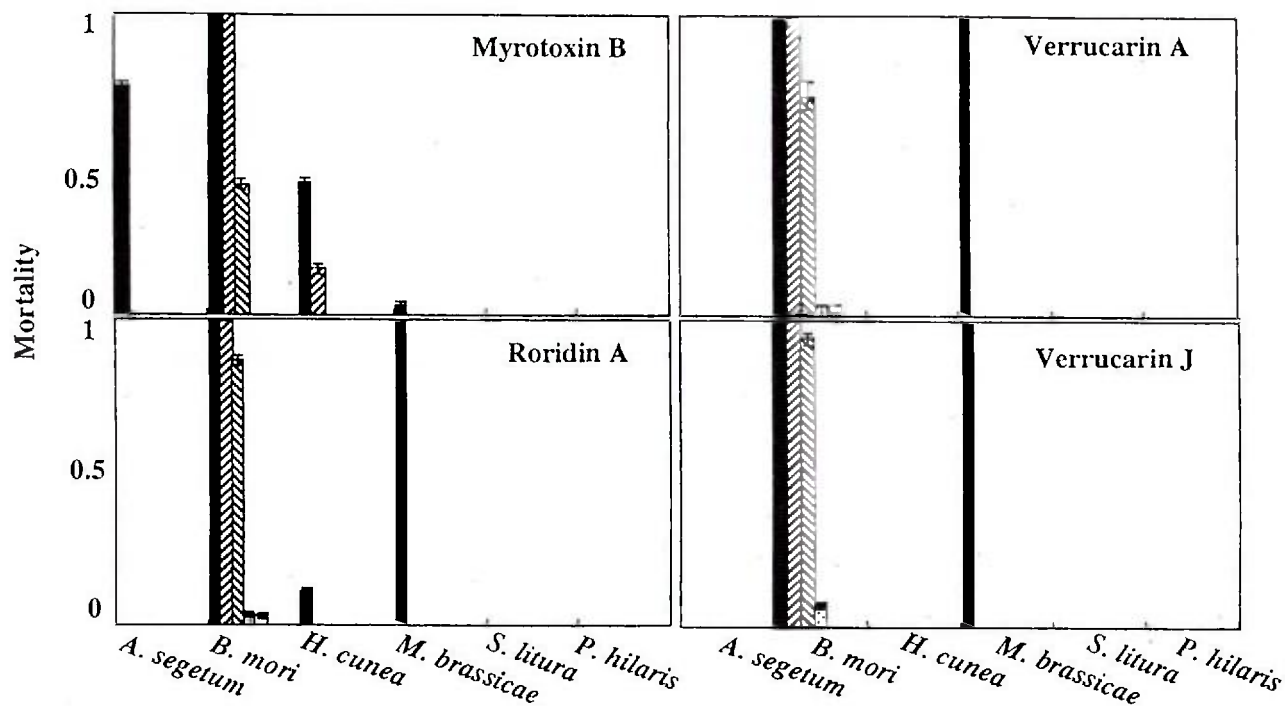


Fig. 4. Insecticidal activity of 2×10^{-7} M to 2×10^{-12} M of myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J for *Agrotis segetum*, *Bombyx mori*, *Hyphantria cunea*, *Mamestra brassicae*, *Spodoptera litura* and *Psacotha hilaris*. Larvae of the insects were fed on artificial food containing : 2×10^{-7} M, 2×10^{-8} M, 2×10^{-9} M, 2×10^{-10} M, 2×10^{-11} M and 2×10^{-12} M of each trichothecene.

Fig 4. Activité insecticide de 2×10^{-7} M à 2×10^{-12} M de la myrotoxine B, de la roridine A et des verrucarines A et J pour *Agrotis segetum*, *Bombyx mori*, *Hyphantria cunea*, *Mamestra brassicae*, *Spodoptera litura* et *Psacotha hilaris*.

On nourrit les larves des insectes sur un milieu artificiel contenant : 2×10^{-7} M, 2×10^{-8} M, 2×10^{-9} M, 2×10^{-10} M, 2×10^{-11} M et 2×10^{-12} M de chaque trichothécène. Bars show standard errors of three replications. / Les barres montrent les intervalles de confiance des trois répétitions.



Fig. 5. Comparison of *Bombyx mori* and *Psacothaea hilaris* fed on myrotoxin B (2×10^{-7} M to 2×10^{-10} M).

Larvae of *B. mori* (upper) and *P. hilaris* (lower) were fed on artificial food containing myrotoxin B. C: control insects were fed on artificial food containing distilled sterilized water.

Fig. 5. Comparaison de *Bombyx mori* et de *Psacothaea hilaris*, nourris sur de la myrotoxine B (de 2×10^{-7} M à 2×10^{-10} M).

On nourrit les larves de *B. mori* (partie supérieure) et de *P. hilaris* (partie inférieure) sur un aliment artificiel contenant de la myrotoxine B. C : Les insectes témoins sont nourris sur un aliment artificiel contenant de l'eau distillée stérilisée.

DISCUSSION

Trichothecenes have caused serious outbreaks of mycotoxicoses in man and in animal (Schieffer *et al.*, 1989) because animals fed on crops containing trichothecenes developed serious symptoms including vomiting, diarrhea, leucopenia, multiple hemorrhage and death (Ueno, 1983). Trichothecenes are divided into macrocyclic trichothecenes having a complicated side chain and non-macrocyclic trichothecenes having simple side chain. Myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J belong to macrocyclic trichothecenes. There are many reports on toxicity of non-macrocyclic trichothecenes (Ueno, 1983) and some reports on toxicity of macrocyclic trichothecene (Culter and Jarvis, 1985). Their toxicities differ not only due to the structure of the trichothecenes but also due to tested living things (Bamburg and Strong, 1971; Ueno, 1983). In this paper, myrotoxin B, roridin A and verrucarins A and J showed various toxicities against microorganisms, plants and insects. Especially, *B. mori* was the most susceptible among tested insects. Therefore, if mulberry leaves are contaminated with trichothecenes, and there is the occurrence of the diseases caused by *M. roridum* and *M. verrucaria*, damage of sericulture may be serious. So far, there are many reports that yield of mulberry leaves decrease due to the occurrence of mulberry diseases but there are no reports on damage of silkworms by pathogens of mulberry. This paper suggests that the *Myrothecium* leaf spot of mulberry caused by *M. roridum* and *M. verrucaria*, damages sericulture directly. There are two reports on occurrence of mulberry leaf disease caused by *M. roridum* in India (Govindajah *et al.*, 1989; Pandey and Singh, 1989), and many reports on occurrence of other plant diseases caused by *M. roridum* or *M. verrucaria* in the world (Chase, 1983; Takano, 1992; Yang and Jong, 1995). Therefore, occurrence of the diseases by *M. roridum* and *M. verrucaria* should be controlled.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. M. Sato for revision of the manuscript and giving us identified weed seeds.

REFERENCES

- BAMBURG, J. R. & STRONG, F. M. (1971) 12, 13-epoxytrichothecenes. In: Microbial toxin. (Kadis, S. Ciegler, A. and Aji, C. J. eds) p207-292. Academic Press New York.
- CHASE, A. R. (1983) Influence of host plant and isolate source on *Myrothecium* leaf spot of foliage plants. *Plant Dis.* 67: 668-671.
- CUTLER, H.G. & JARVIS, B. B (1985) Preliminary observations on the effects of macrocyclic trichothecenes on plant growth. *Environmental and experimental botany* 25: 115-128.
- CUNDLIFFE, E. & DAVIES, J. E. (1977) Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:491-499.
- EHRlich, K. C. & DAIGLE, K. W. (1987) Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12, 13-epoxytrichothecenes. *Biochim. Biophys. Acta* 923: 206-213.
- GOVINDAJAH, K., SENGUPTA, D. D., SHARMA, G. & GUNASEKHAR, V. (1989) A new leaf spot disease of mulberry caused by *Myrothecium roridum* Tode ex Fr. *Current Science* 58: 398.
- GROVE, J. F. (1991) Macrocyclic trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.* 10: 429-448.
- KISHABA, A. N., SHANKLAND, D. L., CRUTIS, R. W. & WILLSON, M.C. (1962) Substances inhibitory to insect feeding with insecticidal properties from fungi. *J. Econ. Entomol.* 55: 211-214.
- MURAKAMI, R., YASUI, H., SHIRATA, A. & KATO, A. (1999) Production of myrotoxin B by *Myrothecium roridum* isolated from *Myrothecium* leaf spot of mulberry in Japan. *J. Seric. Sci. Jpn.* 68: 469-477.
- MURAKAMI, R., KOBAYASHI, T. & TAKAHASHI, K. (2005) *Myrothecium* leaf spot of mulberry caused by *Myrothecium verrucaria*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 153-155.

- MURAKAMI, R., HIRADATE, S. SHIRATA, A. & MITSUHASHI W. (2006) Detection and identification of phytotoxic substances from mulberry leaves inoculated with *Myrothecium verrucaria*, a pathogen of *Myrothecium* leaf spot of mulberry. *Sericologia* 45: 257-269.
- NESPIAK, A., KOCOR, M., & SIEWINSKI, A. (1961) Antibiotic properties of mycelium and metabolites of *Myrothecium roridum* Tode. *Nature* 192: 138-139.
- PANDY, P. C. and SINGH, S. (1989) Three important disease of mulberry in India. *Ind. J. For.* 12: 225-258.
- SCHIEFER, H. B., HANCOCK, D. S. & JARVIS, B. B. (1989) Toxicology of novel macrocyclic trichothecenes, baccharinoid B4, myrotoxin B, and roritoxin B. *J. Vet. Med. A* 36: 152-160.
- TAKAHASHI, K., SEGAWA, H. & KOBAYASHI, T. (1994) *Myrothecium* leaf spot of mulberry caused by *Myrothecium roridum* Tode: Fries. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60: 122-127.
- TAKANO, K. (1992) Leaf spot of vinca (*Vinca rosea* L.) caused by *Myrothecium roridum* Tode ex Fr. in Japan. *Proc. Assoc. Pl. Prot. Hokuriku* 40: 37-42.
- UENO, Y. (1983) Trichothecenes - Chemical, biological and toxicological aspects. *Devel. Food Sci.* 4: 135-146.
- YANG, S. M. & JONG, S. C. (1995) Host range determination of *Myrothecium verrucaria* isolated from leafy spurge. *Plant Dis.* 79: 994-997.

**TOXICITES DES METABOLITES SECONDAIRES PRODUITS
PAR DES PATHOGENES DE LA TACHE DE LA FEUILLE
MYROTHECIUM DES MALADIES DU MURIER
(MYROTHECIUM RORIDUM ET M. VERRUCARIA)**

**R. MURAKAMI, S. HAYASAKA, S. WADA, K. TATEISHI, T. ARAKAWA,
K. MIYAMOTO & W. MITSUHASHI**

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

*La myrotoxine B, la roridine A et les verrucarines A et J sont des métabolites secondaires produits par **Myrothecium roridum** et **M. verrucaria**, qui sont des pathogènes qui provoquent la maladie de la tache de la feuille du mûrier. Ces métabolites présentent des toxicités y compris des activités antimicrobiennes contre trois espèces de bactéries gram positives, cinq espèces de levures, 18 espèces de champignons et un microsporidien ; des activités phytotoxiques contre 16 espèces de plantes appartenant à 11 familles et des activités insecticides contre six espèces d'insectes mais ne présentent pas de toxicités contre 12 espèces de bactéries gram négatives et **M. roridum** et **M. verrucaria**.*

INTRODUCTION

On a décrit la maladie de la tache de la feuille du mûrier *Myrothecium* au Japon et on a identifié les pathogènes qui la provoquent comme *Myrothecium roridum* (Takahashi et coll., 1994) et *M. verrucaria* (Murakami et coll., 2005). La myrotoxine B est produite par *M. roridum* (Murakami et coll., 1999) et la roridine A et les verrucarines A et J sont produites par *M. verrucaria* (Murakami et coll., 2006). La myrotoxine B, la roridine A et les verrucarines A et J appartiennent aux trichothécènes. Les trichothécènes sont produits par certaines espèces appartenant aux genres *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrytis*, *Trichoderma*, *Trichothecium* et *Verticimonosporium* en tant que métabolites secondaires. Les trichothécènes présentent des toxicités contre les eucaryotes parce qu'ils inhibent la synthèse des protéines dans les cellules eucaryotiques (Cundliffe et Davis, 1977 ; Ehrlich et Daigle, 1987) et il existe de nombreux rapports sur les toxicités des trichothécènes, qui ont un large éventail d'activités biologiques dont des activités insecticides (Kishaba et coll., 1962), antifongiques, antibactériennes (Nespiak et coll., 1961), phytotoxiques (Bamburg et Strong, 1971 ; Cutler et Jarvis, 1985) et cytotoxiques (Schiefer et coll., 1989). En 1991, plus de 170 trichothécènes ont été décrits (Grove, 1991) et on sait que leurs toxicités diffèrent en fonction de leurs structures chimiques (Bamburg et Strong, 1971). Cependant, les examens des toxicités des trichothécènes sont limités en raison de la quantité insuffisante de trichothécènes isolés (Schiefer et coll., 1989 ; Ueno, 1983).

Jusqu'à présent, nous avons isolé la myrotoxine B, la roridine A et les verrucarines A et J produits par ces pathogènes, pour évaluer leur toxicité. Dans cet article, nous avons examiné les activités antimicrobiennes, phytotoxiques, insecticides des quatre trichothécènes mentionnés ci-dessus contre certains micro-organismes, plantes et insectes.

MATERIELS ET METHODES

Trichothécènes :

On a cultivé les pathogènes provoquant la tache de la feuille du mûrier *Myrothecium* (souche M9403 de *M. roridum* et souche M9583 de *M. verrucaria*) sur un milieu agar de saccharose et de pomme de terre (PSA : 2 % de saccharose et 1,8 % d'agar dans un bouillon de pomme de terre à 20 %) à 25° C pendant un mois. On isole la myrotoxine B, la roridine A et les verrucarines A et J des extraits de milieu, en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (Murakami et coll., 1999 ; Murakami et coll., 2006).

Test des micro-organismes :

On utilise six espèces de bactéries gram positives, 11 espèces de bactéries gram négatives, cinq espèces de levures, 20 espèces de champignons et un protozoaire (Tableau I). Tous les tests sont répétés trois fois.

Tests des bactéries et des levures :

On mélange 10^6 cfu (unité de formation de colonie) / ml de chaque bactérie et de chaque levure avec du milieu semi-synthétique de Wakimoto (0,5 % peptone, 1,5 % de saccharose, 0,05 % de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,2 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,5 % d'agar dans 30 % de bouillon de pomme de terre), puis on creuse le milieu avec un emporte pièce (6 mm de diamètre). On place $10 \mu\text{l}$ de 2×10^{-7} M de myrotoxine B, de roridine A et des verrucarines A et J dans le trou et on incube les inoculum à 25° C pendant deux jours. Nous avons estimé que les trichothécènes utilisés présentent des toxicités contre les bactéries et les levures testées quand des zones d'inhibition apparaissent autour du trou.

Tests des champignons :

On place dix micro litres de 2×10^{-7} M de chaque trichothécène sur les hyphes de chaque champignon (5×5 mm) sur du PSA et on incube les inoculum à 25° C. Nous avons jugé que les activités antifongiques sont positives quand le diamètre de la colonie du champignon qui s'est formée, auquel on a appliqué le trichothécène, est plus petit que lorsqu'on a appliqué de l'eau distillée stérilisée (DSW).

Test du microsporidien :

On immerge les spores de *Nosema bombycis* dans 2×10^{-7} M de myrotoxine B à 25° C pendant 30 min, puis on les lave avec de l'eau distillée stérilisée. On traite les spores lavées avec 0,1 M de chlorure de potassium contenant 3 % d'eau oxygénée. On calcule le taux de germination des spores. On estime que l'activité antimicrosporidienne par la myrotoxine B est positive quand le taux de germination des spores auquel on applique de la myrotoxine B est plus faible que lorsqu'on applique de l'eau distillée.

Plantes testées :

Test herbicide :

On cultive 16 espèces de plantes appartenant à 11 familles (Tableau II) à $25 \pm 2^\circ$ C en serre et on applique 2×10^{-7} M de myrotoxine B, de roridine A et de verrucarines A et J aux feuilles et aux tiges. On utilise trois plantes pour chaque test et on les vérifie trois, sept et dix jours après l'application.

Test de germination :

On trempe du papier filtre dans 2×10^{-7} M à 2×10^{-13} M de chaque trichothécène. On place plus de 10 graines d'*Arabidopsis thaliana*, de *Nicotiana benthamiana*, d'*Oenothera speciosa* et de *Setaria italica* sur du papier, puis on les incube à 25° C. On compte le nombre de graines qui a germé au bout de 10 jours après l'application. Pour le témoin, on place les graines des quatre espèces sur du papier

trempé dans de l'eau distillée, puis on calcule les taux de germination. On calcule le taux d'inhibition moyen de la germination (IRG = taux de graines non germées auxquelles on applique du trichothécène / taux de germination du témoin) pour les trois répétitions.

Insectes testés :

On procède à des inoculations *per os* avec de la myrotoxine B, de la roridine A et des verrucarines A et J. On nourrit vingt individus d'*Agrotis segetum*, de *Bombyx mori*, d'*Hyphantria cunea*, de *Mamestra brassicae* et de *Spodoptera litura* et dix individus de *Psacotha hilaris* (larves du 3^{ème} âge) sur de l'aliment artificiel (Shirukumeito R, Nihon Nosan Kogyo K. K., Yokohama) avec de 2×10^{-7} M à 2×10^{-12} M de chacun des trichothécènes et on les conserve jusqu'à leur nymphose à 25° C. On compte le nombre d'insectes morts et on calcule la mortalité moyenne de chaque insecte (nombre d'insectes morts / nombre d'insectes testés) pour trois répétitions. Comme témoin, on nourrit les larves de six espèces sur un milieu avec de l'eau distillée stérile.

Analyse statistique :

On transforme la valeur de l'IRG et la mortalité en valeurs arc-sinus avant l'analyse statistique. On soumet les données à l'ANOVA à deux facteurs et au test post-hoc Scheffe avec le logiciel StatView 4.0

RESULTATS

Activités antimicrobiennes :

Nous avons jugé que la myrotoxine B et la roridine A et les verrucarines A et J présentent clairement des activités antibactériennes contre *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis* et *Curtobacterium flaccumfaciens* en raison de l'apparition d'une zone d'inhibition autour du trou traité avec 2×10^{-7} M de chacun des trichothécènes (Tableau I). En ce qui concerne le test de la levure, une zone claire d'inhibition apparaît autour du trou traité avec 2×10^{-7} M de chacun des trichothécènes. Nous avons donc jugé que chacun des trichothécènes présente des toxicités contre les levures testées. Dans les tests des champignons, sans *M. roridum* et *M. verrucaria*, le diamètre des colonies auquel on applique 2×10^{-7} M de chacun des trichothécènes est plus petit que celui des colonies auxquelles on a appliqué de l'eau distillée stérilisée (Fig. 1). Dans les tests avec *M. roridum* et avec *M. verrucaria*, le diamètre des colonies auxquelles on a appliqué chacun des trichothécènes est de la même taille que celles auxquelles on applique de l'eau distillée stérilisée. Nous avons donc jugé que chacun des trichothécènes présente des activités antifongiques contre les champignons testés sans *M. roridum* et *M. verrucaria*. Le taux de germination des spores de *N. bombycis* auquel on applique de l'eau distillée stérilisée est de 89,5 %, tandis que 88,8 % et 84,8 % des spores auxquelles on applique 2×10^{-11} M et 2×10^{-7} M de myrotoxine B, germent respectivement. Nous avons donc estimé que la myrotoxine B présente une activité antimicrosporidienne contre *N. bombycis*.

Activités phytotoxiques :

Activités herbicides :

La couleur des feuilles de toutes les plantes auxquelles on applique 2×10^{-7} M de chacun des trichothécènes brunit ou jaunit au bout de sept jours après l'application (Fig. 2). Nous avons donc jugé que 2×10^{-7} M de myrotoxine B, de roridine A et des verrucarines A et J présentent des activités herbicides contre les plantes testées. *Amaranthus blitum*, *A. lividus*, *Arabidopsis thaliana*, *Eclipta prostrata*, *Oenothera speciosa*, *Nicotiana benthamiana* et *Persicaria thunbergii* semblent être plus sensibles que les autres plantes testées avec l'application. Ces feuilles abîmées tombent et puis de nouvelles feuilles émergent.

Inhibition de la germination :

Pour les témoins, les taux de germination des quatre espèces testées est de 98 - 100 %. L'IRG de chaque plante est affecté par chaque concentration de chaque trichothécène ($p < 0,007$ à l'ANOVA dans la Fig. 3). Nous considérons donc que chaque trichothécène inhibe la germination des plantes testées. L'IRG de 2×10^{-13} M de chaque trichothécène est de 0 % mais la longueur de la tige et de la racine des jeunes plants est plus courte que celle des jeunes plants auxquelles on applique de l'eau distillée stérilisée. Il existe des différences significatives entre l'IRG de *N. benthamiana* et l'IRG de *A. taliana* ($p = 0,009$) avec le test de Scheffe) et entre l'IRG de *N. benthamiana* et l'IRG de *O. speciosa* ($p = 0,04$) et entre l'IRG de *N. benthamiana* et l'IRG de *S. italica* ($p < 0,0001$) avec la myrotoxine B. Nous avons donc considéré que *N. benthamiana* est plus sensible à l'application de myrotoxine B que les autres plantes testées.

Activités insecticides :

Chez les témoins, les mortalités des six espèces testées sont de 0 % parce que toutes les larves se transforment en pupes. La mortalité de chaque insecte est affectée par la concentration de chaque trichothécène ($0,02 < p < 0,03$ en fonction de l'ANOVA dans la Fig. 4) et non affectée par le type de trichothécènes testés. Parmi les insectes testés, nous considérons que *B. mori* est le plus sensible à l'application de chaque trichothécène, parce qu'il y a des différences significatives entre la mortalité de *B. mori* et la mortalité des autres insectes ($p < 0,002$ avec le test de Scheffe). Tous les *B. mori* qui se nourrissent sur le milieu artificiel contenant 2×10^{-7} M des trichothécènes meurent dans l'heure après les traitements et tous les *B. mori* nourris sur un milieu avec 2×10^{-8} M de trichothécènes meurent en un jour. La croissance des *B. mori* qui survivent et qui sont alimentés avec 2×10^{-9} M des quatre trichothécènes (taux de survie : 56,7 % pour la myrotoxine B, 13,3 % pour la roridine A, 26,7 % pour la verrucarine A, 6,7 % pour la verrucarine J) et la croissance de *B. mori* nourrit avec 2×10^{-10} M de chaque trichothécène s'arrête (Fig. 5) et les larves ne se transforment pas en pupes. On trouve des larves mortes d'*A. segetum* nourries avec 2×10^{-7} M de myrotoxine B et de *H. cunea* nourrie sur un aliment avec 2×10^{-7} M à 2×10^{-8} M de myrotoxine B et tous les *M. brassicae* nourris sur un aliment avec 2×10^{-7} M de roridine A et de verrucarines A et J meurent. La longueur du corps et le poids des larves de *A. segetum*, *H. cunea* et *M. brassicae*, nourries sur chacun des trichothécènes, qui survivent, sont moins importantes que celles des larves nourries sur un régime sans trichothécène. *S. litura* et *P. hilaris* ne meurent pas dans ces tests mais la croissance des larves nourries sur chacun des trichothécènes s'arrête. En conséquence, nous estimons que chaque trichothécène présente des activités insecticides contre les insectes testés.

DISCUSSION

Les trichothécènes ont provoqué de graves éruptions de mycotoxicoses chez l'homme et l'animal (Schieffer et coll., 1989) parce que les animaux nourris sur des cultures contenant des trichothécènes développent de graves symptômes, dont les vomissements, la diarrhée, la leucopénie, les hémorragies multiples et la mort (Ueno, 1983). Les trichothécènes se divisent en trichothécènes macrocycliques, qui ont une chaîne latérale compliquée et en trichothécènes non-macrocycliques, qui ont une chaîne latérale simple. La myrotoxine B, la roridine A et les verrucarines A et J appartiennent aux trichothécènes macrocycliques. Il existe de nombreux rapports sur la toxicité des trichothécènes non macrocycliques (Ueno, 1983) et certains rapports sur la toxicité des trichothécènes macrocycliques (Culter et Jarvis, 1985). Leurs toxicités diffèrent non seulement en fonction de la structure des trichothécènes mais aussi en fonction des organismes vivants testés (Bamburg et Strong, 1971 ; Ueno, 1983). Dans cet article, la myrotoxine B, la roridine A et les verrucarines A et J présentent des toxicités variées contre les micro-organismes, les plantes et les insectes. En particulier, *B. mori* est le plus sensible des insectes testés. En conséquence, si les feuilles de mûrier sont contaminées par les trichothécènes et que les maladies provoquées par *M. roridum* et *M. verrucaria* sont présentes, les

dégâts pour la sériciculture peuvent être importants. Jusqu'à présent, il existe beaucoup de rapports sur la baisse du rendement en feuilles de mûrier provoquée par l'éruption de maladies du mûrier, mais il n'y a pas de rapports sur les dégâts provoqués par les pathogènes du mûrier chez les vers à soie. Cet article suggère que la tache de la feuille *Myrothecium* du mûrier, provoquée par *M. roridum* et *M. verrucaria* nuit directement à la sériciculture. Il existe deux rapports sur l'éruption de la maladie de la feuille de mûrier provoquée par *M. roridum* en Inde (Govindajah et coll., 1989 ; Pandey et Sing, 1989) et de nombreux rapports sur l'éruption d'autres maladies des plantes provoquées par *M. roridum* ou *M. verrucaria* dans le monde (Chase, 1983 ; Takano, 1992 ; Yang et Jong, 1995). Il faudrait donc lutter contre l'éruption des maladies provoquées par *M. roridum* et *M. verrucaria*.

APPLICATION OF SODIUM HYPOCHLORITE FOR CONTROLLING VIROSIS AND BACTERIOSIS IN TASAR SILKWORM, *ANTHEREA MYLITTA* D.

ALOK SAHAY, N. G. OJHA, V. KULSHRESTHA, G. P. SINGH, D.K. ROY & N. SURYANARAYANA

Silkworm pathology Laboratory, Central Tasar Research & Training Institute, Piska, Nagri, Ranchi - 835303 (Jharkhand - India).

*Laboratory experiments and field trials of the Sodium Hypochlorite (NaOCl) as a disinfectant, confirmed that, it reduces the mortality of the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. due to virosis and bacteriosis by checking the multiplication and transmission rate of the respective pathogens, AmCPV and *Bacillus* isolates.*

*Laboratory experiments were conducted by inoculating the healthy tasar silkworms with AmCPV (1.5×10^6 POBs/ml) and *Bacillus* isolates (2×10^7 cells/ml) separately followed by the treatment with Sodium hypochlorite (available chlorine 4% W/v) at (0.001, 0.01 and 0.1%) concentrations. During field trials, Sodium hypochlorite was applied during the rearing of tasar silkworms in outdoor condition at various Regional Tasar Research Stations, Basic seed multiplication & Training Centers. The results indicated that the application of this chemical significantly reduced ($P < 0.05$) the mortality (%) due to virosis and bacteriosis without affecting the larvae adversely.*

Keywords: Virosis, bacteriosis, sodium hypochlorite, *Antheraea mylitta* D.

INTRODUCTION

Antheraea mylitta Drury is an economically important insect, which produces the tropical tasar silk. Due to the outdoor mode of rearing, the silkworm larvae suffer heavy loss due to diseases and pests. On an average 30% of total crop loss due to various diseases is observed per year (Jolly *et al.*, 1974). Pebrine, bacteriosis and virosis disease are caused by *Nosema* sp., *Bacillus* isolates and AMCPV respectively. Of these, the bacterial and viral diseases are major factors in reducing the cocoon yield. Since curative measures are not found effective, different preventive methods are followed to protect the silkworms from disease. Disinfection and maintenance of hygiene during rearing are essential factors for prevention of silkworm diseases. Various disinfectants namely, formalin (Kagawa, 1980), bleaching powder (Kobayashi *et al.*, 1968; Balavenkatasubbaiah *et al.*, 1995; Ananthalakshmi *et al.*, 1995), Calcium hydroxide (Ishiwata and Zhou, 1988) and Chlorine dioxide (Balavenkatasubbaiah *et al.*, 1999) have been used effectively to minimize disease incidences.

Different antibiotics viz. Triazoles, Triadime, Streptomycine sulphate, Gentamycine, Cloxacillin, Kanamycine, Chloramphenicol, Tetracycline and Aureofungin were used for control of *Bombyx mori* diseases (Rai and Devaiah, 1988; Baig *et al.*, 1990; Javare Gowda *et al.*, 1990; Sreedhara *et al.*, 1991). Sodium hypochlorite as egg surface sterilant (Vail *et al.*, 1968) was also reported in *B. mori*. Keeping in view the effectivity of Sodium hypochlorite in Sericulture, the present experiment was designed to observe the efficacy of this chemical against virosis and bacteriosis of *A. mylitta*.

MATERIALS AND METHODS

Antheraea mylitta Cytoplasmic polyhedrosis virus (AmCPV):

Fresh cytoplasmic polyhedrosis virus inoculum was prepared from diseased silkworm. Completely whitened midgut obtained from cytoplasmic polyhedrosised silkworm at an advanced stage of infection was homogenized in sterile distilled water. The polyhedral suspension was filtered through a cheese cloth and the filtrate was centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and the polyhedra were purified following Aizawa (1971) by repeated and differential centrifugation. The resultant pellet suspended in distilled water was examined by light microscope for purity. The polyhedra suspension in sterile distilled water was prepared to contain 1.5×10^6 polyhedra/ml.

The culture stock solution of silkworm Pathology section was used for preparing the 2×10^5 cells/ml of bacterial inoculums. Different concentrations (0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 and 0.1) of Sodium hypochlorite (NaOCl) (BDH) containing 4% chlorine (W/v) were prepared by adding sterile distilled water in the stock solution and used against *Bacillus* isolates *in vitro* to determine the mean sterilization concentration (MSC) for the inactivation of bacterial pathogens.

The suspension of the pathogens were added in equal volume of Sodium hypochlorite solution of different concentrations during 10, 20 and 30 minutes were given for determining the mean sterilization time (MST) of Sodium hypochlorite for inactivation of pathogens.

0.1 ml of the solution of *Bacillus* isolates were added separately to 5.0 ml of sterilized nutrient broth and incubated at $25 \pm 1^\circ \text{C}$. the growth of the pathogens were observed daily for 7 days. For each concentration and time, 5 slants as replications were maintained.

The results of mean sterilization concentration and time confirmed *in vitro* helped in preparation of only three nearby concentrations (0.001, 0.01 & 0.1%) of NaOCl.

Inoculation of pathogen and rearing of larvae:

1.0 ml of the suspension of each pathogen was centrifuged and the suspended pellet was exposed individually to 0.1 ml of the above mentioned concentrations of the disinfectant for different durations viz. 10, 20 and 30 min at room temperature ($25 \pm 1^\circ \text{C}$). The suspended pathogen was centrifuged and the supernatant was discarded. The traces of disinfectants were removed by washing the pellets twice in sterile distilled water by centrifugation. The final pellet was resuspended in 0.1 ml of sterile distilled water individually. The inoculations were given before resumption of feeding after first moult out, by smearing the prepared inoculum suspension evenly on arjuna leaves (*Terminalia arjuna*). Untreated pathogen's suspensions were smeared on the arjuna leaves and were fed to the larvae of control batches. Five replications with 100 larvae each were maintained separately for each pathogen and all concentrations of the disinfectant. Both treated and inoculated control batches were reared indoor under normal rearing conditions up to survival. The observations on development of diseases symptoms and larval mortality were made. The dead larvae in different treatments during rearing were examined microscopically for presence of concerned pathogens. Data recorded for mortality due to concerned pathogen were statically analyzed using Completely Randomized Design (CRD) (Snedecor and Cochran, 1971).

Another set of experiment was designed for field conditions. Silkworms of a single day hatched eggs were selected and brushed on the *T. arjuna* bushes under natural conditions. 100 worms were brushed in each replication; five replications were maintained for the treatments. Similar replications were maintained for the control lot also. The concentration (0.01%) which was found quite effective *in vitro* experiments and was safe from host plants point of view was sprayed on the body of silkworm larvae during rearing. First spraying was done after 24 hours of second moult. One time spraying was done during 2nd, 3rd and 4th instar and two times during 5th instar after a gap of eight days.

In control lot no chemical was applied. Observations on development of disease symptoms and larval mortality were made. The experiments were conducted at various Basic seed multiplication centers (BSM&TCS) and Regional Tasar Research Stations (RTRS) of Central Tasar Research and

Training Institute, Ranchi. The data were recorded, pooled and analyzed statistically using Randomized Block Design (RBD).

RESULTS AND DISCUSSION

Effectiveness of disinfectant against *Antheraea mylitta* cytoplasmic polyhedrosis (AmCPV):

The results presented in Table II show all the concentrations were found effective in inactivating the AmCPV of tasar silkworm. The percent of inactivation of pathogen varied according to the concentrations used. Among all the concentrations tested 0.1% concentration of NaOCl, was found most effective. In 0.1% treatment for 10, 20 and 30 min 26.00, 19.00 and 17.00 larvae respectively were found infected with virosis (AmCPV), which were significantly lower ($P < 0.05$) than inoculated control (91.00%). The infection of AmCPV increased to 62.00, 52.00 and 40.00 at 0.001 concentrations with treatment duration of 10, 20 and 30 minutes. Whereas in the 0.01% concentration at 10, 20 and 30 minutes the mortality was observed to the tune of 48.00, 40.00 and 30.00. However all the three treatments and time durations were significantly different ($P < 0.05$) with each other as well as with control.

The microscopic examination of polyhedral bodies revealed that the polyhedral bodies of AmCPV were dissolved at greater extent, when they were directly exposed to 0.1 % concentration for 30 minutes and virions became inactivated as very less mortality due to virosis in silkworms was recorded after feeding of this treated inoculum.

Table I. Growth of *Bacillus* isolates *in vitro* after sterilization with different concentrations of NaOCl at different duration.

Tableau I. Croissance d'isolats de *Bacillus* *in vitro* après la stérilisation avec différentes concentrations de NaOCl pendant différentes durées.

Disinfectant <i>Désinfectant</i>	Concentrations	Sterilization time for <i>Durée de stérilisation pour</i>					
		Bacillus isolate (a) <i>Isolat Bacillus (a)</i>			Bacillus isolate (b) <i>Isolat Bacillus (b)</i>		
NaOCl		10 min	20 min	30 min	10 min	20 min	30 min
	0.0005	+	+	+	+	+	+
	0.001	+	+	±	+	+	±
	0.005	+	±	±	+	±	±
	0.01	+	±	-	+	±	-
	0.05	±	±	-	±	±	-
	0.1	±	-	-	±	-	-
	Inoculated Control <i>Témoin inoculé</i>	+	+	+	+	+	+

- 100% inhibition of growth of pathogen. / 100 % d'inhibition de la croissance du pathogène.

± Partial inhibition of growth of pathogen. / Inhibition partielle de la croissance du pathogène.

+

Table II. Percent of virosis infection after inoculation of POBs of AmCPV (1.5×10^6) treated with NaOCl in the tasar silkworm, *A. mylitta* D.

Tableau II. Pourcentage de l'infestation virale après l'inoculation de POB d'AmCPV ($1,5 \times 10^6$) traités avec du NaOCl chez le ver à soie tasar *A. mylitta* D.

Duration (minutes)	Concentration			Control
<i>Durée (minutes)</i>	0.001	0.01	0.1	<i>Témoin</i>
10	62.00 (51.96)	48.00 (43.85)	26.00 (30.60)	91.00 (72.63)
20	52.00 (46.12)	40.00 (39.18)	19.00 (25.81)	91.00 (72.63)
30	40.00 (39.19)	30.00 (33.16)	17.00 (24.34)	91.00 (72.63)

Parentheses values are in Arcsine transformation / Les valeurs entre parenthèses sont la transformation Arcsinus.

"F" test / Test « F »:

- Concentration (799.66)**, Duration / *Durée* (36.56)**, Con. $\times$ Duration / Con $\times$ *Durée* (6.64)**

C.D at 5%:

- Concentration (1.965), Duration / *Durée* (1.702), Con. $\times$ Duration / Concentration $\times$ *Durée* (3.404)

Effectiveness of Disinfectant against *Bacillus* isolates:

The growth of *Bacillus* isolates in culture medium was not observed in any replication when they were treated with 0.1% of Sodium hypochlorite for 20 minutes (Table I). For 100% inactivation of *Bacillus* isolates 0.1% concentration and 30 minutes duration were the mean sterilization concentration and time respectively.

Results presented in Table III indicate that the different concentrations of NaOCl were quite effective in inactivating *Bacillus* isolates spores. In 0.1% concentration treated batches, the bacterial infection was very low (18.00) at 30 min followed by 20 minutes treatment (24.00) and 10 minutes treatment (31.00) and all values were significantly different ($P < 0.05$) compared to the inoculated control (86.00%). Infection of bacteriosis increased with the reduction in concentrations and duration of the treatment. At 0.001% concentration the mortality recorded for 10, 20 and 30 minutes were 52.00, 42.00 and 30.00 respectively.

The results of the present study indicated that all concentrations of NaOCl were significantly ($P < 0.05$) effective in the inactivation of both AmCPV and *Bacillus* isolates spores. 100% inactivation of AmCPV and spores of *Bacillus* spp was observed only at 0.1% concentration (30 minutes treatment).

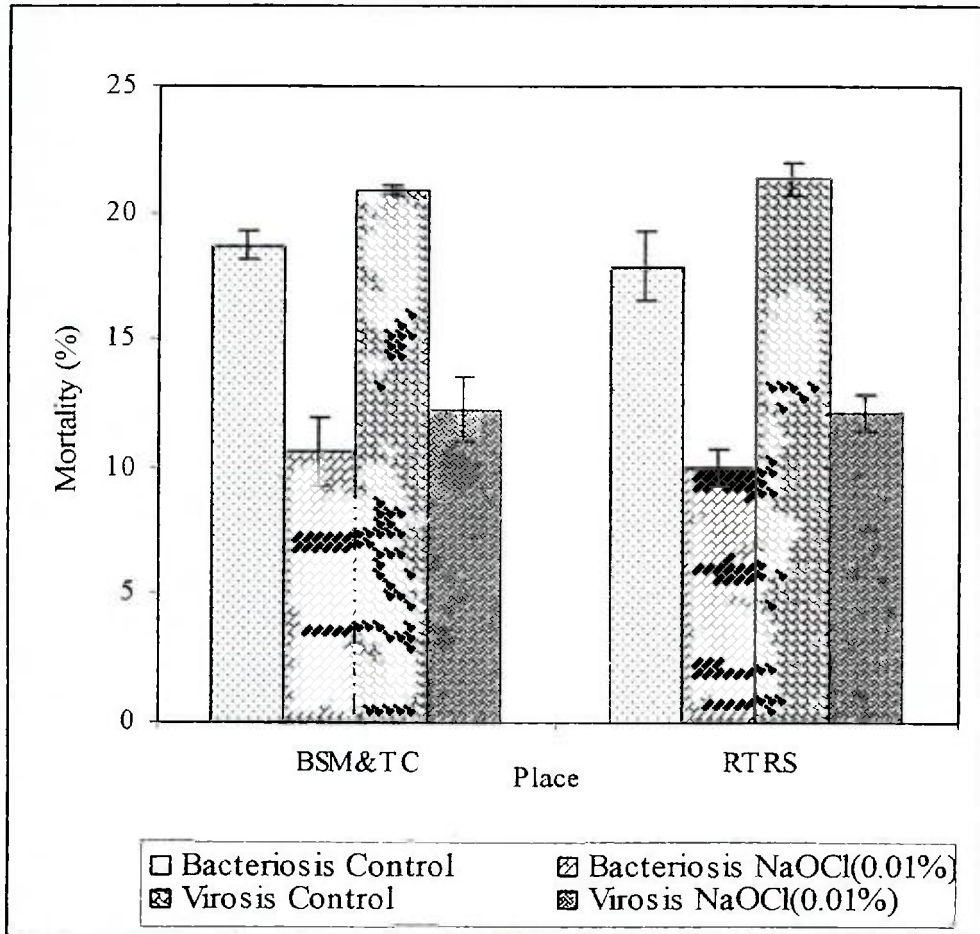


Fig 1. Effect of Sodium hypochlorite against virosis and bacteriosis in tasar silkworm, *A. mylitta* D. (Based on Arcsine transformation).

Fig. 1. Effet de l'hypochlorite de sodium contre la virose et la bactériose chez le ver à soie tasar, *A. mylitta* D. (d'après la transformation Arcsinus).

When the Sodium hypochlorite was applied at field level, it reduced the mortality due to virosis and bacteriosis quite significantly ($P < 0.05\%$) when compared with control without causing any adverse effect on the cocoon commercial characters (Table IV & Fig. 1). At Basic seed multiplication centers the average bacterial mortality recorded was 3.42% (pooled value) which was much less than control, 10.25% (pooled value). Whereas at Regional Research Station level the average bacterial disease incidence recorded was 3.01% (pooled value) against control 9.45% (pooled value). At both levels the reduction of bacteriosis was significantly different ($P < 0.05\%$) against control (Table IV & Fig. 1).

Table III. Percent of bacterial infection after inoculation of *Bacillus* isolates (a & b) spores (2×10^5) treated with NaOCl in the tasar silkworm, *A. mylitta* D.

Tableau III. Pourcentage d'infestation bactérienne après l'inoculation de spores (2×10^5) d'isolats de *Bacillus* (a et b) traitées avec du NaOCl chez le ver à soie tasar, *A. mylitta* D.

Duration (minutes)	Concentrations			Control
<i>Durée (minutes)</i>	0.001	0.01	0.1	<i>Témoin</i>
10	52.00 (46.14)	39.00 (38.63)	31.00 (33.80)	86.00 (68.23)
20	42.00 (40.36)	35.00 (36.23)	24.00 (29.29)	86.00 (68.23)
30	30.00 (33.10)	26.00 (30.44)	18.00 (25.03)	86.00 (68.23)

Parentheses values are in Arcsine transformation / Les valeurs entre parenthèses sont la transformation Arcsinus.

"F" test / Test « F »:

- Concentration (463.80) **, Duration (29.41) ** / *Durée* (29,41) **, Con. × Duration (3.97) ** / *Conc.* × *Durée* (3,97) **

C.D at 5% / DC à 5 %:

- Concentration (2.28), Duration / *Durée* (1.978), Con. × Duration / *Conc.* × *Durée* (3.957)

Similarly for Virosis, the mortality (%) at BSM&TCs level was 4.53% (pooled value) against control 12.67% (pooled value). At RTRS level the corresponding values were 4.41 % (pooled value) and 13.24 % (pooled value) for treatment as well as for control respectively (Table III) percent of bacterial infection after inoculation of *Bacillus* isolates (a & b) spores (2×10^5) treated with Naocl in the tasar silkworm, *A. mylitta* D.

The values of E.R.R. (%), Cocoon Wt (g) and Shell wt (g) were significantly different ($P < 0.05\%$) against the corresponding control values at Basic Multiplication centers (BSM&TC) and Regional Tasar Research Stations (RTRS) (Table -IV & Fig -2)

The bactericidal and virucidal effect of active chlorine and Naocl was reported by Subba Rao *et al*, 1992 and Vial *et al.*, 1968 respectively. Sodium hypochlorite (0.05-0.5%) effectively reduced the viability and infectivity of the *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana* and nuclear polyhedrosis virus (NPV) in cabbage looper, (Ignoffo and Dutky, 1963). The bactericidal action of Naocl is caused primarily by the release of hypochlorous acid (HOCl). However, the hypochlorite ion OCl^- may be a contributing factor since alkaline hypochlorite solutions show some antibacterial potency. In either case the normal protoplasmic balance is disrupted in the living cell which eventually caused the death of the respective pathogens.

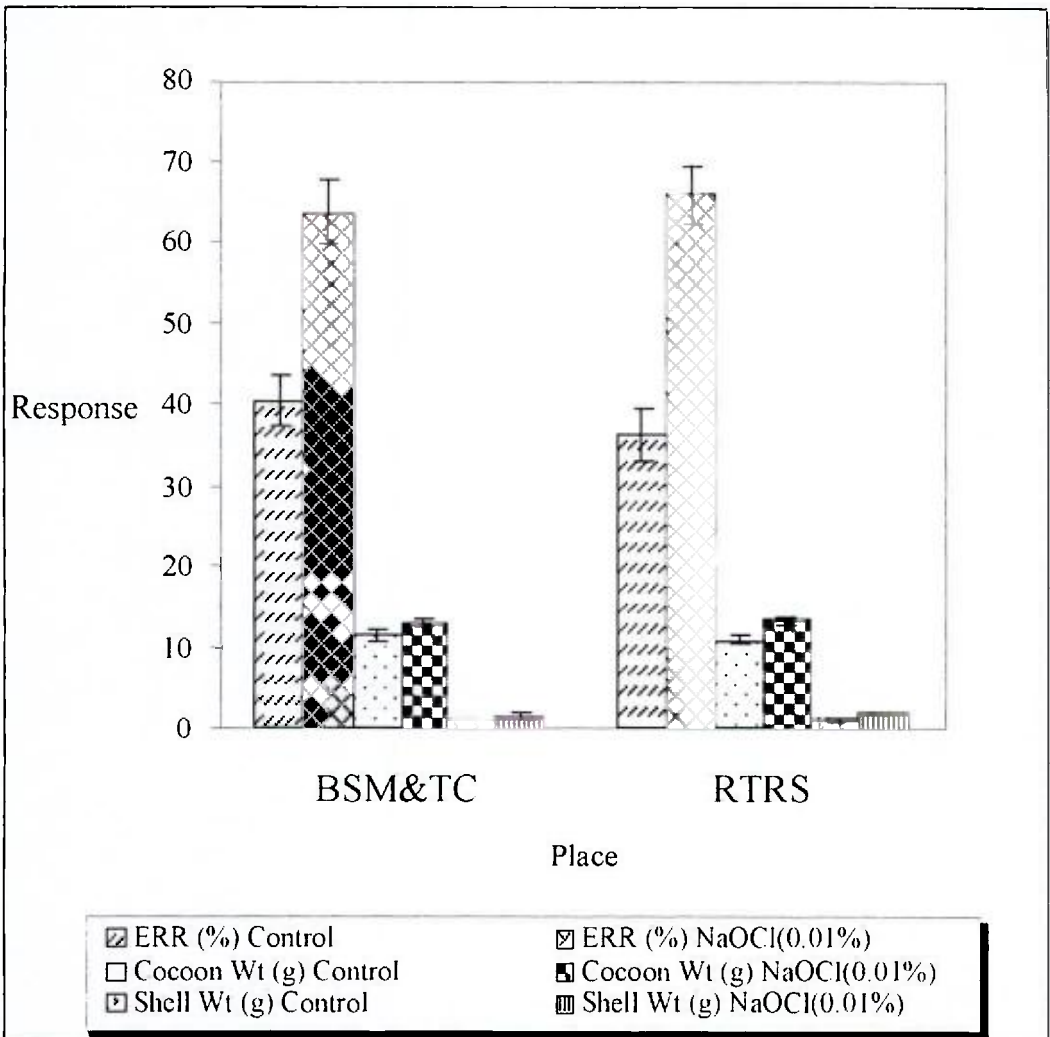


Fig. 2. Effect of Sodium hypochlorite on the commercial characters of *A. mylitta*.

*Fig. 2. Effet de de l'hypochlorite de sodium sur les caractères commerciaux d'*A. mylitta*.*

Table IV. Effect of Sodium hypochlorite against virosis, bacteriosis and commercial characters of tasar Silkworm, *A. mylitta* D.

Tableau IV. Effet de l'hypochlorite de sodium contre la virose et la bactériose ainsi que sur les caractères commerciaux du ver à soie tasar, A. mylitta D.

Place	Treatment	Bacteriosis	Virosis	Cocoon Characters		
Lieu	Traitement	Bactériose	Virose	Caractères du cocon		
	NaOCl (0.01 %)			E.R.R. (%)	Cocoon Wt. Poids du cocon (g)	Shell Wt. Poids de la coque (g)
BSM & TC	Treatment <i>Traitement</i>	3.42 (10.60)	4.53 (12.24)	63.60	12.97	1.74
	Control <i>Témoin</i>	10.25 (18.67)	12.67 (20.85)	40.33	11.38	1.28
RTRS	Treatment <i>Traitement</i>	3.01 (9.97)	4.41 (12.10)	65.98	13.29	1.95
	Control <i>Témoin</i>	9.45 (17.87)	13.24 (21.33)	36.23	10.95	1.96
"F" Test For <i>Test "F" pour</i>	Place <i>Lieu</i>	2.15 (2.15)	0.53 (0.20)	0.33	0.08	0.56
	Treatment <i>Traitement</i>	256.36 (269.07)	760.31 (534.66)	309.37	105.89	98.38
	Place × Treatment <i>Lieu × traitement</i>	0.22 (0.03)	1.26 (0.64)	4.61	3.91	6.95
CD at 5% <i>DC à 5 %</i>	Place <i>Lieu</i>	1.06	0.84	3.28	0.41	0.13
	Treatment <i>Traitement</i>	1.06	0.84	3.28	0.41	0.13
	Place × Treatment <i>Lieu × traitement</i>	1.499	1.188	4.64	0.58	0.19

Parentheses values are in Arcsine transformation / *Les valeurs entre parenthèses sont la transformation Arcsinus.*

Though the best efficacy was observed at 0.1% concentration of the treatment at laboratory level, but due to the corrosive nature of the chemical it gave some burning effect on the host plant foliage, hence it is recommended to use 0.01% concentration of the chemical safely.

REFERENCES

- AIZAWA, K. (1971) Structure of polyhedra and virus particles of cytoplasmic polyhedrosis; in *The cytoplasmic polyhedrosis of the silkworm*. Aruga, H. and Y. Tanada (eds), pp.23-36. Univ, Tokyo Press, Tokyo.
- ANANTHALAKSHMI K.V.V.; BAIG M & DATTA R.K (1995) Effect of temperature and duration of treatment on the germicidal activity of selected disinfectants against *Nosema bombycis*, Current Technology Seminar on Seed Technology, Silkworm seed technology Laboratory, Kodathi, Bangalore., India, Nov 17-18, p 45.
- BAIG M.; NATARAJU B.; AND SAMSON M.V. (1990) Studies on the effect of antibiotics on rearing performance and loss due to disease in silkworm, *Bombyx mori*. Indian J. Seric., 29(1): 54-58.
- BALAVENKATASUBBAIAH M.; ANANTHALAKSHMI, K.V.V. SELVAKUMAR, T.; NATARAJU, B. & DATTA, R.K. (1999) Chlorine dioxide, a new disinfectant in sericulture Indian J. Seric., 38(2): 125-130.
- BALAVENKATASUBBAIAH M, NATARAJU, B & DATTA. R.K.: (1995) Efficacy of chlorine dioxide and virkon-S as disinfectants against pathogens of silkworm *Bombyx mori* L. Current Technology Seminar on Silkworm Disease management, Silkworm rearing Technology and Mulberry Pathology, October 25-26 Central sericultural research and Training, Berhampore, India p.12.
- IGNOFFO C.M. & DUTKY S. (1963) The effect of sodium hypochlorite on the viability and infectivity of *Bacillus* and *Beauveria* spores and cabbage looper nuclear polyhedrosis virus. J. Insect Pathol. 5, 422-426
- ISHIWATA Y. & ZHOU, C.Q (1988) Inactivation by the treatment of Nuclear polyhedrosis virus of the silkworm *Bombyx mori* L with calcium hydroxide solution. J. seric. Sci. Jpn. 57:511-518.
- JAVARE GOWDA B.L.; VISWASWARA GOWDA & JAYARAMAIAH, M.. (1990) In vitro evaluation of selected antifungal antibiotics against the fungus *Beauveria bassina* (Bals) Vuil, pathogenic to the silkworm *Bombyx mori* linn. In Recent Trends in sericulture. Jasti Pramoda Kumari (Eds), S.V. University, Tirupati, India.
- JOLLY M.S, SEN S.K. & AHSAN M. M (1974.) Tasar Culture. Central Silk Board, Ambika Publication, Bombay,
- KOBAYASHI H; SATO F & AYUZAWA, K. (1968) On the disinfecting ability of the mixture of bleaching powder and formalin. J. seric. Sci. Jpn., 37; 311-318.
- KAGAWA T. (1980) The efficacy of formalin as disinfectant of *Nosema bombycis* spores. J. Seric. Sci. Jpn. 49(3):218-222.
- RAI, B.R. & DEVAIAH M.C. (1988) Effect of antibiotics on the incidence of disease in silkworm *Bombyx mori* L. International Congress on Tropical sericulture Practices, Bangalore, India.
- RAO SUBBA G., CHANDRA A.K. & BHATTACHARYA J. (1992) Effect of bleaching powder and lime against grasserie and muscardine diseases of the silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 31(1), 37-40.
- SNEDECOR, W.G. & W.E. COCHRAN (1971) Statistical Methods. Oxford IHB Publishing Co., New Delhi.
- SREEDHARA V.M.; SHREE M.P.; BORAIH G.A & FLETCHER R.A. (1991) Muscardine disease of silkworm controlled by triazoles. Sericologia, 31:423-426.
- VAIL P.V., T.J. HENNEBERRY, A.N. KRISHABA & K.Y. ARAKAWA (1968) Sodium hypochlorite and formalin antiviral agents against nuclear polyhedrosis virus in larvae of the Cabbage looper. J. Invertebr. Pathol. 10, 84-93.

APPLICATION D'HYPPOCHLORITE DE SODIUM POUR LUTTER CONTRE LES VIROSES ET LES BACTERIOSES CHEZ LE VER A SOIE TASAR, *ANTHEREAEA MYLITTA* D.

ALOK SAHAY, N. G. OJHA, V. KULSHRESTHA, G. P. SINGH, D. K. ROY & N. SURYANARAYANA

Silkworm Pathology Laboratory, Central Tassar Research & Training Institute, Piska, Nagri, Ranchi – 835 303 (Jharkhand – Inde).

*Les expériences en laboratoire et les essais sur le terrain avec l'hypochlorite de sodium (NaOCl) comme désinfectant confirment qu'il diminue la mortalité du ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* D., provoquée par les viroses et les bactérioses, en enrayant le taux de multiplication et de transmission des pathogènes respectifs, les isolats d'AmCPV et de *Bacillus*.*

*On réalise des expériences en laboratoire par inoculation de vers à soie tassar sains avec les isolats de AmCPV ($1,5 \times 10^6$ POBs / ml) et de *Bacillus* (2×10^6 cellules / ml), suivi par le traitement avec les concentrations (0,001 ; 0,01 et 0,1 %) d'hypochlorite de sodium (chlorure disponible 4 % P / v). Pendant les essais sur le terrain, on applique l'hypochlorite de sodium pendant l'élevage des vers à soie tassar à l'extérieur dans plusieurs Stations de Recherche Régionales sur le Tassar, et dans des Centres de Base de Multiplication des Graines et de Formation. Les résultats indiquent que l'application de ce produit chimique diminue significativement ($P < 0,05$) la mortalité (%), provoquée par la virose et par la bactériose sans avoir d'effet négatif sur les larves.*

INTRODUCTION

Antheraea mylitta Drury est un insecte important sur le plan économique, qui produit la soie tassar tropicale. Compte tenu du mode d'élevage à l'extérieur, les larves de ver à soie subissent des pertes importantes à cause des maladies et des parasites. On observe, en moyenne, 30 % de pertes totales de récoltes par an, à cause des différentes maladies (Jolly et coll., 1974). La pébrine, les bactérioses et les viroses sont provoquées respectivement par *Nosema* sp., des isolats de *Bacillus* et AmCPV. Les maladies bactériennes et virales sont les principaux facteurs qui diminuent le rendement en cocons. Puisque les mesures curatives ne sont pas efficaces, on a adopté différentes méthodes de prévention pour protéger les vers à soie des maladies. La désinfection et le maintien de l'hygiène pendant l'élevage sont des facteurs essentiels pour prévenir les maladies des vers à soie. Différents désinfectants se sont avérés efficaces à savoir le formol (Kagawa, 1980), le chlorure de chaux (Kobayashi et coll., 1968 ; Balavenkatasubbaiah et coll., 1995 ; Ananthalakshmi et coll., 1995), l'hydroxyde de calcium (Ishiwata et Zhou, 1988) et le dioxyde de chlore (Balavenkatasubbaiah et coll., 1999) pour minimiser les incidences des maladies.

On a aussi utilisé différents antibiotiques, tels que les triazoles, le triadime, le sulfate de streptomycine, la gentamycine, la cloxacilline, la kanamycine, le chloramphénicol, la tétracycline, et l'auroéofugine pour lutter contre les maladies de *Bombyx mori* (Rai et Devaiah, 1998 ; Baig et coll., 1990 ; Javare Gowda et coll., 1990 ; Sreedhara et coll., 1991). Par ailleurs, on a rapporté l'utilisation de l'hypochlorite de sodium comme stérilisant de la surface de l'œuf (Vail et coll., 1968) chez *B. mori*.

Compte tenu de l'efficacité de l'hypochlorite de sodium en sériciculture, nous avons réalisé cette expérience pour observer l'efficacité de ce produit chimique contre la virose et la bactériose d'*A. mylitta*.

MATERIELS ET METHODES

Virus de la polyédrose cytoplasmique d'*Antheraea mylitta* (AmCPV) :

On prépare un inoculum du virus de la polyédrose cytoplasmique à partir d'un ver à soie malade. On homogénéise l'intestin moyen complètement blanchi, provenant d'un ver à soie atteint par la polyédrose cytoplasmique à un stade avancé d'infestation, dans de l'eau distillée stérile. On filtre la suspension polyédrale au travers d'une mousseline et on centrifuge le filtrat à 3000 tpm pendant 15 min. et on purifie les polyèdres en suivant la méthode d'Aizawa (1971) par une centrifugation répétée et différentielle. On examine au microscope optique la pureté du culot qui en résulte, suspendu dans de l'eau distillée. On prépare la suspension des polyèdres dans de l'eau distillée stérile pour contenir $1,5 \times 10^6$ polyèdres / ml.

On utilise la solution mère de la culture provenant de la Section de Pathologie du Ver à soie pour préparer 2×10^5 cellules / ml d'inoculum bactériens. On prépare les différentes concentrations (0,0005 ; 0,001 ; 0,005 ; 0,01 ; 0,05 et 0,1) d'hypochlorite de sodium (NaOCl) (BDH), contenant 4 % de chlorure (P/v) en ajoutant de l'eau distillée stérile dans la solution mère et on l'utilise contre les isolats de *Bacillus in vitro* pour déterminer la concentration moyenne de stérilisation (MSC) pour l'inactivation des pathogènes bactériens.

On ajoute les suspensions de pathogènes en volume égal à la solution d'hypochlorite de sodium aux différentes concentrations, pendant 10, 20 et 30 minutes, pour déterminer la durée de stérilisation moyenne (MST) avec l'hypochlorite de sodium pour l'inactivation des pathogènes.

On ajoute séparément 0,1 ml de solution des isolats *Bacillus* à 5,0 ml de milieu nutritif stérilisé, que l'on incube à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et on observe la croissance des pathogènes quotidiennement pendant 7 jours. Pour chaque concentration et chaque durée, on maintient 5 tubes comme répétitions.

La confirmation des résultats pour la concentration et pour la durée moyennes de stérilisation obtenus *in vitro* permet de préparer seulement trois concentrations voisines (0,001, 0,01 et 0,1 %) de NaOCl.

Inoculation du pathogène et élevage des larves :

On centrifuge 1 ml des suspensions de chacun des pathogènes et on expose individuellement le culot suspendu à 0,1 ml de désinfectant aux concentrations mentionnées ci-dessus pendant les différentes durées, c'est-à-dire 10, 20 et 30 min. à température ambiante ($25 \pm 1^\circ \text{C}$). On centrifuge le pathogène suspendu et on jette le surnageant. On enlève les traces de désinfectant en lavant les culots deux fois dans de l'eau distillée stérile par centrifugation. On resuspend individuellement le culot final dans 0,1 ml d'eau distillée. On procède aux inoculations, avant la reprise de l'alimentation après la première mue, en étalant la suspension d'inoculum sur les feuilles d'arjuna (*Terminalia arjuna*), de manière régulière. On étale les suspensions de pathogènes non traités sur des feuilles d'arjuna avec lesquelles on nourrit les larves des lots témoins. On maintient séparément cinq répétitions de 100 larves pour chaque pathogène et pour toutes les concentrations de désinfectant. On élève à la fois les lots traités et les lots témoins inoculés, à l'intérieur, dans des conditions normales d'élevage jusqu'à la survie. On procède aux observations sur le développement des symptômes de la maladie et sur la mortalité larvaire. On examine les larves mortes pendant l'élevage avec les différents traitements, au microscope, pour évaluer la présence des pathogènes concernés. On analyse statistiquement les données enregistrées concernant la mortalité avec les pathogènes concernés en utilisant une Conception Complètement Aléatoire (CRD) (Snedecor et Cochran, 1971).

On conçoit un autre lot d'expérience pour les conditions de terrain. On sélectionne les œufs de ver à soie un jour après l'éclosion et on les lève sur des buissons de *T. arjuna* dans des conditions

naturelles. On lève 100 vers pour chaque répétition ; on maintient cinq répétitions pour les traitements. On maintient aussi des répétitions similaires pour le lot témoin. La concentration de 0,01 % qui s'avère assez efficace dans les expériences *in vitro* et est sûre du point de vue des plantes hôtes est vaporisée sur le corps des larves de vers à soie pendant l'élevage. On procède à la première vaporisation 24 heures après la deuxième mue. On procède à une vaporisation pendant le 2^{ème}, le 3^{ème} et le 4^{ème} âge et à deux vaporisations pendant le 5^{ème} âge à un intervalle de huit jours.

On n'applique pas de produit chimique chez le lot témoin. On procède aux observations sur le développement des symptômes de la maladie et sur la mortalité larvaire. Les expériences sont réalisées dans divers Centres de Base de Multiplication des graines et dans des Stations de Recherche Régionales du Tasar (RTRS) du *Central Tassar Research and Training Institute*, de Ranchi. On enregistre, on regroupe et on analyse les données sur le plan statistique en utilisant une Conception Aléatoire en Blocs (RBD).

RESULTATS ET DISCUSSION

Efficacité des désinfectants contre la polyédrose cytoplasmique d'*Antheraea mylitta* (AmCPV) :

Les résultats présentés dans le Tableau II montrent que toutes les concentrations s'avèrent efficaces pour inactiver l'AmCPV du ver à soie tasar. Le pourcentage de désactivation du pathogène varie selon les concentrations utilisées. Parmi toutes les concentrations testées, la concentration de NaOCl à 0,1 %, s'avère la plus efficace. Avec le traitement de 0,1 % pendant 10, 20 et 30 min., 26, 19 et 17 % des larves s'avèrent infestées par la virose (AmCPV), ce qui est significativement moins ($P < 0,05$) que le témoin inoculé (91 %). L'infestation AmPCV est de l'ordre de 62, 52 et 40 % à des concentrations de 0,001 %, avec une durée de traitement de 10, 20 et 30 minutes. Tandis qu'avec une concentration de 0,01 % pendant 10, 20 et 30 minutes, on observe une mortalité de l'ordre de 48,00 ; 40 et 30 %. Cependant, les trois traitements et durées sont significativement différents ($P < 0,05$) les uns des autres et du témoin.

L'examen microscopique des corps polyédraux révèle que les corps polyédraux d'AmCPV se dissolvent à un plus grand degré, quand on les expose directement à une concentration de 0,1 %, pendant 30 minutes, et les virions se désactivent, puisqu'on enregistre une mortalité beaucoup moins importante provoquée par la virose, chez les vers à soie, après les avoir nourris avec cet inoculum traité.

Efficacité du désinfectant contre les isolats de *Bacillus* :

On n'observe pas de croissance des isolats de *Bacillus* dans le milieu de culture dans aucune des répétitions, quand on les traite avec 0,1 % d'hypochlorite de sodium pendant 20 minutes (Tableau I). Pour une inactivation de 100 % des isolats de *Bacillus*, une concentration de 0,1 % et une durée de 30 minutes sont respectivement la concentration et la durée de stérilisation moyennes.

Les résultats présentés dans le Tableau III indiquent que les différentes concentrations de NaOCl sont tout à fait efficaces pour désactiver les spores des isolats de *Bacillus*. Chez les lots traités avec une concentration à 0,1 % pendant 30 minutes, l'infestation bactérienne est très faible (18,00), suivie par le traitement de 20 minutes (24,00) et le traitement de 10 minutes (31,00) et toutes les valeurs sont significativement différentes ($P < 0,05$) par comparaison au témoin inoculé (86 %). L'infestation bactérienne augmente avec la diminution des concentrations et de la durée du traitement. Avec une concentration de 0,001 % la mortalité enregistrée pendant 10, 20 et 30 minutes est de respectivement 52,00 ; 42,00 et 30,00 %.

Les résultats de cette étude indiquent que toutes les concentrations de NaOCl sont significativement efficaces ($P < 0,05$) pour désactiver à la fois AmCPV et *Bacillus*. On n'observe 100 % d'inactivation d'AmCPV et des spores de *Bacillus* spp. qu'avec la concentration à 0,1 % (traitement de 30 minutes).

Quand on applique de l'hypochlorite de sodium sur le terrain, cela diminue la mortalité provoquée par la virose et par la bactériose de manière significative ($P < 0,05$ %) par comparaison au témoin, sans causer d'effet négatif sur les caractères commerciaux du cocon (Tableau IV et Fig. 1). Dans les Centres de Base de Multiplication des Graines, la mortalité bactérienne moyenne enregistrée est de 3,42 % (valeurs regroupées), ce qui est beaucoup moins que chez le témoin, 10,25 % (valeurs regroupées). Tandis qu'au niveau de la Station de Recherche Régionale, l'incidence moyenne de maladie bactérienne enregistrée est de 3,01 % (valeurs regroupées) contre 9,45 % chez le témoin (valeurs regroupées). Pour ces deux niveaux, la bactériose est significativement différente ($P < 0,05$ %) par rapport au témoin (Tableau IV et Fig. 1).

De la même façon, pour la virose, la mortalité (%) au niveau des BSM&TC est de 4,53 % (valeurs regroupées) contre 12,67 % chez le témoin (valeurs regroupées). Au niveau du RTRS, les valeurs correspondantes sont de 4,41 % (valeurs regroupées) et 13,24 % (valeur regroupée) respectivement pour le traitement ainsi que pour le témoin (Tableau III), concernant le pourcentage d'infestation bactérienne après l'inoculation des spores (2×10^5) des isolats de *Bacillus* (a & b), traités avec du NaOCl chez le ver à soie tasar, *A. mylitta* D.

Les valeurs pour l'E.R.R. (%), le poids du cocon (g) et le poids de la coque (g) sont significativement différentes ($P < 0,05$ %) des valeurs correspondantes pour le témoin dans les Centres de Multiplication de Base (BSM&TC) et dans les Stations de Recherche Régionales sur le Tasar (RTRS) (Tableau IV & Fig. 2).

Subba Rao et coll. 1992 et Vial et coll., 1968 ont respectivement décrit l'effet bactéricide et antiviral du chlorure actif et du NaOCl. L'hypochlorite de sodium (0,05 - 0,5 %) diminue efficacement la viabilité et l'infectiosité de *Bacillus thuringiensis*, de *Beauveria bassiana* et du virus de la polyédrose nucléaire (NPV) chez l'arpeuse du chou, (Ignoffo et Dutky, 1963). L'action bactéricide du NaOCl est principalement provoquée par la libération de l'acide hypochloreux (HOCl). Cependant, l'ion hypochlorite OCI^- pourrait être un facteur contributif puisque les solutions alcalines d'hypochlorite présentent un pouvoir antibactérien. Dans les deux cas, l'équilibre protoplasmique normal est perturbé dans la cellule vivante, ce qui finit par causer la mort des pathogènes.

On observe la meilleure efficacité avec une concentration à 0,1 % pour le traitement au niveau du laboratoire, mais compte tenu de la nature corrosive du produit chimique, qui entraîne des brûlures sur le feuillage de la plante hôte, on recommande une concentration du produit chimique à 0,01 %, pour une utilisation sans risque.

CHARACTERIZATION OF SEVEN MULBERRY GENOTYPES FOR THEIR LEAF QUALITY AND BIOASSAY WITH SILKWORM *BOMBYX MORI* L.

JALAJA S. KUMAR & D. M. RAM RAO

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

The leaf quality characters were studied in seven-mulberry genotypes viz., V-1, V-2, V-4, K-2, S-13, S-36, and S-54, under field conditions of CSR&TI, Mysore. The quality traits viz., leaf moisture, moisture retention (after 6 hrs of harvest), protein, nitrogen, carbohydrate, amino acid contents were found to be high in V-1 followed by V-4 and S-36. On the other hand, these traits were found to be low in V-2 and K-2. The individual amino acids viz., threonine, histidine and methionine were also higher in these three genotypes as compared to other genotypes. Nitrate reductase (NR) activity and leaf yield were high in V-1 followed by V-4 and S-36, whereas, they were low in control K2. The bioassay study with silkworm race PM × NB4D2 also revealed that the silkworm growth and cocoon characters were optimum when the leaves of V-1, V-4 and S-36 were fed to the larvae. Overall study revealed that the genotypes V-1, V-4 and S-36 were superior to other genotypes in terms of leaf quality, leaf quantity and enzyme (NR) activity. Therefore, these three genotypes can be used as one of the parents in hybridization programme in order to develop superior quality genotypes.

Keywords: Mulberry, leaf quality, NR activity, amino acids, silkworm growth, cocoon characters.

INTRODUCTION

Leaf quality of mulberry (*Morus* spp.) plays an important role in the nutrition of the silkworm (*Bombyx mori* L.), which in turn produces cocoons and silk. Since the production of fine quality cocoons depends on providing good quality leaves to silkworm, the development of superior quality leaf has become one of the prime objectives in mulberry breeding programme. Leaf quality is influenced by a number of factors such as variety, cultivation practices, incidence of pests and diseases, method of harvesting and preservation of leaves (Krishnaswami *et al.*, 1970; Koul *et al.*, 1980; and Sastry *et al.*, 1988).

Many research workers have extensively studied the importance of leaf quality and its influence on silkworm rearing. (Fonseca *et al.*, 1993; Sarkar *et al.*, 1997; Sujathamma *et al.*, 2001 and Sinha *et al.*, 2003). Several scientists have reported different quality traits such as leaf moisture content, protein content, carbohydrate content, nitrogen content, amino acid content and chlorophyll content are responsible for leaf quality (Bongale *et al.*, 1991; Chaluvachari and Bongale, 1995 and Bose and Bindroo, 2001). According to some of the scientists, the combination of two traits i.e., nitrogen and total amino acid contents at higher quantity determines the leaf quality (Machii, 1989; Machii and Katagiri, 1991 and Suryanarayana and Shivashankar, 2002). All the quality traits or nutrients may not be available at highest level in a genotype (Sujathamma and Dandin, 2000), as there are several factors, such as nutrients uptake, absorption of water, nitrogen utilization efficiency etc., which are involved and differ from genotype to genotype. Therefore, it is most essential to identify a genotype

possessing some of the important quality traits together, which may help to improve the growth and cocoon characters of silkworm.

In view of these facts an attempt was made to analyze some of the important biochemical traits in seven genotypes. Also special emphasis was made to analyze certain important individual components of amino acids, threonine, histidine and methionine (Machii and Katagiri, 1991), which are related to the silkworm growth and cocoon characters. Further, to evaluate and confirm the superior leaf quality of these genotypes a bioassay study was done with silkworm race PM × NB4D2.

MATERIALS AND METHODS

An experiment was conducted at Central Sericultural Research and Training Institute (CSR&TI) Mysore, to study the leaf quality characters of seven-mulberry genotypes viz., S-13, S-36, S-54, V-1, V-2, V-4 and K-2 (Control). The research station, CSR&TI is located in tropical region of Karnataka, India. For the study healthy saplings were raised from all the genotypes and 1400 saplings were transplanted to the main field with a spacing of 90 cm × 90 cm. The experiment was laid out in randomized block design by using 50 saplings/ replication; four such replications were maintained for each genotype. Cultural operation, FYM and fertilizer application were followed as per the recommended norms of CSR&TI, Mysore (Krishnaswami, 1978). Five harvests were collected every 65 – 70 days of crop growth, leaf quality parameters were determined in matured (12 – 14th leaf from shoot apex) leaves.

The leaf quality traits such as leaf moisture content, moisture retention capacity (after 6 hours of harvest) were estimated by following the method of Vijayan *et al.*, (1996). Total chlorophyll content was analyzed by adopting the method of Hiscox and Israelstam (1979). Nitrate reductase (NR) enzyme activity was estimated in mature leaves following the method of Scot and Neyra (1979). Further, mature leaves samples once collected, were processed, dried and used for analyzing protein content (Lowry *et al.*, 1951), total amino acid contents by following ninhidrin method (Spies, 1955) using leucine as standard and total nitrogen content was estimated following the micro- kjeldhal method (Jackson, 1973). Starch and sugar content (soluble carbohydrates) were analyzed by the method of Mc Cready (1960) and Dubios *et al.*, (1956) respectively. Certain individual amino acids viz., threonine, histidine and methionine were also estimated in the leaves by adopting the method of Price (1963). The experiment was repeated thrice and average data on different leaf quality traits were computed and analyzed statistically (Snedecor and Cochran, 1967). Twenty plants at random were selected replication wise from each of the seven genotypes on 70th day from date of pruning and data on leaf yield/ plant was recorded and later converted to ton/ha/crop.

Further, to identify the genotypes with superior leaf quality character, a bioassay study was conducted with the crossbreed silkworm race of PM × NB4 D2 for three different seasons. The rearing was carried out following the silkworm rearing technologies (Krishnaswami, 1978). Mulberry leaves were collected replication wise from each of these seven genotypes and used for feeding the silkworms until spinning. Average of three seasons data on larval growth and cocoon characters such as larval duration, weight of 10 mature larvae (g), yield/10,000 larvae (by no.), yield/10,000 larvae (by wt.), single cocoon weight (g), single shell weight (g), shell ratio (%), were recorded and analyzed statistically (Snedecor and Cochran, 1967).

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf quality traits:

The important leaf quality traits viz., protein, nitrogen, carbohydrate, amino acids, chlorophyll and moisture contents were analyzed in mature leaves of seven mulberry genotypes are summarized in Table I.

Table I. Leaf quality characters and NR activity of seven mulberry genotypes.

Tableau I. Caractères qualitatifs de la feuille et activité NR de sept génotypes de mûrier

Variety	Leaf moisture content (%)	Moisture retention (after 6 hrs) (%)	Total chlorophyll (mg / g f.wt.)	Protein (%)	Nitrogen (%)	Sugar (%)	Starch (%)	Total amino acids (mg / g dry wt)	Nitrate reductase activity μ gm No2 hr / g f. wt	Leaf yield (ton / ha / crop)
Variété	Teneur en eau de la feuille (%)	Rétention de l'eau (au bout de 6 hrs) (%)	Chlorophylle totale (mg / g p. frais)	Protéines (%)	Azote (%)	Sucres (%)	Amidon (%)	Acides aminés totaux (mg / g de poids sec)	Activité nitrate-réductase μ gm No 2 hr / g p. f	Rendement foliaire (tonne / ha / récolte)
K-2	69.50 $\pm$ 2.17	76.25 $\pm$ 2.24	2.80 $\pm$ 0.07	18.34 $\pm$ 1.07	3.14 $\pm$ 0.34	12.76 $\pm$ 0.07	10.52 $\pm$ 0.27	260.2 $\pm$ 6.81	9.2 $\pm$ 0.07	8.17 $\pm$ 1.83
S-13	73.52 $\pm$ 3.64	80.51 $\pm$ 6.36	3.35 $\pm$ 0.01	21.24 $\pm$ 1.09	3.92 $\pm$ 0.07	11.94 $\pm$ 0.06	10.76 $\pm$ 0.16	274.5 $\pm$ 7.51	11.2 $\pm$ 0.61	9.37 $\pm$ 1.75
S-36	75.14 $\pm$ 4.53	81.27 $\pm$ 4.38	2.55 $\pm$ 0.11	23.89 $\pm$ 0.91	4.18 $\pm$ 0.91	13.70 $\pm$ 0.14	11.35 $\pm$ 0.31	302.6 $\pm$ 7.84	12.5 $\pm$ 0.32	9.45 $\pm$ 1.67
S-54	74.55 $\pm$ 4.52	79.54 $\pm$ 3.47	3.04 $\pm$ 0.06	22.23 $\pm$ 0.82	3.69 $\pm$ 0.61	13.19 $\pm$ 0.17	11.07 $\pm$ 0.28	286.4 $\pm$ 8.80	10.4 $\pm$ 0.41	9.07 $\pm$ 2.53
V-1	75.93 $\pm$ 5.46	82.17 $\pm$ 4.51	3.24 $\pm$ 0.07	24.56 $\pm$ 0.71	4.25 $\pm$ 0.66	14.98 $\pm$ 0.25	12.23 $\pm$ 0.31	327.7 $\pm$ 9.01	15.4 $\pm$ 0.56	14.37 $\pm$ 1.08
V-2	70.25 $\pm$ 2.36	77.56 $\pm$ 5.16	3.06 $\pm$ 0.03	21.35 $\pm$ 1.05	3.58 $\pm$ 0.67	12.84 $\pm$ 0.46	10.75 $\pm$ 0.41	265.8 $\pm$ 10.34	10.3 $\pm$ 0.34	8.80 $\pm$ 1.06
V-4	75.67 $\pm$ 3.44	81.64 $\pm$ 6.43	3.12 $\pm$ 0.02	22.87 $\pm$ 1.00	4.07 $\pm$ 0.76	13.76 $\pm$ 0.34	11.27 $\pm$ 0.23	314.7 $\pm$ 16.51	13.7 $\pm$ 0.51	10.67 $\pm$ 1.02
CD 5%	NS	0.89	0.51	1.02	0.23	0.71	NS	12.10	2.15	2.75

In general, all the genotypes showed better leaf quality performance as compared to K2. One of the most important quality traits is leaf moisture content, which maintains the nutritive levels of leaves and in turn improves its palatability for silkworm. Leaf moisture is a genetic character influenced by soil moisture and root proliferation nature of a variety (Sujathamma and Dandin, 2000). In the present study, leaf moisture content (LMC) and moisture retention capacity (MRC) estimated were found to be the highest in V-1 (75.93% and 82.17%) followed by V4 (75.67% and 81.64%) and S-36 (75.14% and 81.27%), while these two traits were found to be the lowest in K2 (69.50% and 76.25%). Leaves characterized by higher LMC and MRC are identified as superior quality leaves (Bongale and Chaluvachari, 1995). Also these two traits are closely associated with the feeding efficiency and growth rate of silkworm larvae (Paul *et al.*, 1992 and Chaluvachari and Bongale, 1995). Total chlorophyll content was the highest in S-13 (3.35mg/g fresh wt.), V-1 (3.24 mg/g fresh wt.) and V-4 (3.12mg/g fresh wt.), while it was the lowest in S-36 (2.55mg/g fresh wt.). Higher chlorophyll content in leaves indicates the photosynthetic efficiency; therefore it can be used as one of the criteria for quantifying photosynthetic rate in mulberry (Sujathamma and Dandin, 2000). The protein content is another important leaf quality trait; its optimum dietary level should be 20–25 %, which is required for optimal growth of silkworm larvae (Horie, 1980). Among the seven genotypes, total protein content was the highest in V-1 (24.56%) followed by S-36 (23.89%) and V-4 (22.67%), whereas it was the lowest in K2 (18.34%). Higher leaf protein content is closely associated with higher moisture and moisture retention capacity in leaves and favours the larval weight and moulting ratio in II moult (Chaluvachari and Bongale, 1996). Also it was reported that low LMC and protein content in leaves affects the larval growth rate and cocoon weight (Li and Sonu, 1984). On the other hand, Machii and Katagiri (1991) opined that increased protein content beyond the optimal level in mulberry leaves leads to a marginal improvement in cocoon productivity. In mulberry leaves carbohydrates are available in plenty (Hiratsuka, 1917) and it was reported to be chief source of energy for silkworm (Horie, 1978). Carbohydrates are estimated based on the amount of sugar and starch content available in leaves (Bose and Bindroo, 2001). In the present study these two traits were the highest in V-1 (14.98% and 12.23%) and V-4 (13.76% and 11.27%), while they were low in control K2 (12.76% and 10.52%). If the leaves have high carbohydrate content, silkworms gain more energy and in turn may enhance the synthesis of silk protein.

Total nitrogen and amino acids contents were the two important factors, which determine the leaf quality (Machii, 1989). Among the genotypes significant difference were not observed for these two traits, however, slight improvement was recorded in V-1 (4.25% and 327.7 mg/g dry wt.), V-4 (4.07% and 314.7 mg/g dry wt.) and S-36 (4.18% and 302.6mg/g dry wt.) when compared to control K2 (3.14% and 260.2mg/g dry wt.). It was reported that varieties possessing high nitrogen and amino acid contents in leaves are nutritively superior and promote growth and development of silkworm (Machii and Katagiri, 1991; Suryanarayana and Shivashankar, 2002). Higher amino acids and protein contents are of particular importance to the silkworm larvae because of their active utilization for the synthesis of silk protein (Sujathamma and Dandin, 2000). Certain important individual components of amino acids viz., threonine, histidine and methionine that are more related to the growth of silkworm (Machii, 1989) were estimated in mature leaves showed variation in different genotypes. Among the seven genotypes, these amino acids were found high in V-1 followed by S-36 and V-4, while these amino acids were low in V-2 and K2 (Fig.1). The presence of higher concentration of histidine and methionine helps for better growth and development of silkworm and an increased concentration of threonine enhance the synthesis of silk protein (Machii and Katagiri, 1991). According to Gilmour (1961) methionine, a sulphur containing amino acid serves as a source of sulphhydryl groups, which are responsible for the synthesis of coenzymes and hormones in silkworm. The increased level of methionine in V-1, V-4 and S-36 indicates that leaves may contain higher sulphur concentration as compared to other genotypes. Significant relationship between sulphur concentration in mulberry leaves and cocoon quality characters was reported by Zhao *et al* (2001).

Table II. Rearing performance of cross breed PM × NB₄D₂ (ave. of 3 seasons).Tableau II. Performance d'élevage de l'hybride PM × NB₄D₂ (moyenne de 3 saisons).

Variety	Larval duration day:hrs	Wt. of 10 mature Larvae (g)	Yield/ 10,000 larvae by no.	Yield/ 10,000 Larvae by wt.	Single cocoon wt. (g)	Single shell wt. (g)	Shell ratio (%)
<i>Variété</i>	<i>Durée larvaire Jour : heures</i>	<i>Pds de 10 larves mûres (g)</i>	<i>Rendement pour 10 000 larves en nbre (g)</i>	<i>Rendement / 10 000 larves en poids</i>	<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
K-2	25.18 ± 2.41	38.33 ± 3.43	9585 ± 130.1	16.66 ± 2.62	1.720 ± 0.16	0.320 ± 0.07	18.60 ± 1.64
S-13	25.12 ± 2.56	42.33 ± 2.82	9400 ± 115.7	18.14 ± 2.41	1.710 ± 0.24	0.310 ± 0.02	18.12 ± 1.32
S-36	25.12 ± 2.51	44.65 ± 3.81	9667 ± 152.5	18.64 ± 3.01	1.728 ± 0.35	0.322 ± 0.01	18.63 ± 1.56
S-54	25.20 ± 1.91	43.11 ± 3.41	8824 ± 161.6	16.38 ± 3.28	1.685 ± 0.61	0.302 ± 0.06	17.92 ± 1.61
V-1	25.06 ± 1.76	47.33 ± 4.01	9800 ± 171.8	19.34 ± 3.16	1.770 ± 0.56	0.336 ± 0.01	18.98 ± 1.76
V-2	25.18 ± 1.84	40.57 ± 3.82	9705 ± 161.9	18.24 ± 3.09	1.732 ± 0.41	0.321 ± 0.02	18.53 ± 1.23
V-4	25.12 ± 1.76	44.78 ± 4.10	9750 ± 174.0	18.42 ± 2.98	1.744 ± 0.52	0.323 ± 0.66	18.52 ± 1.61
CD 5%	NS	2.41	224.0	0.51	0.04	NS	NS

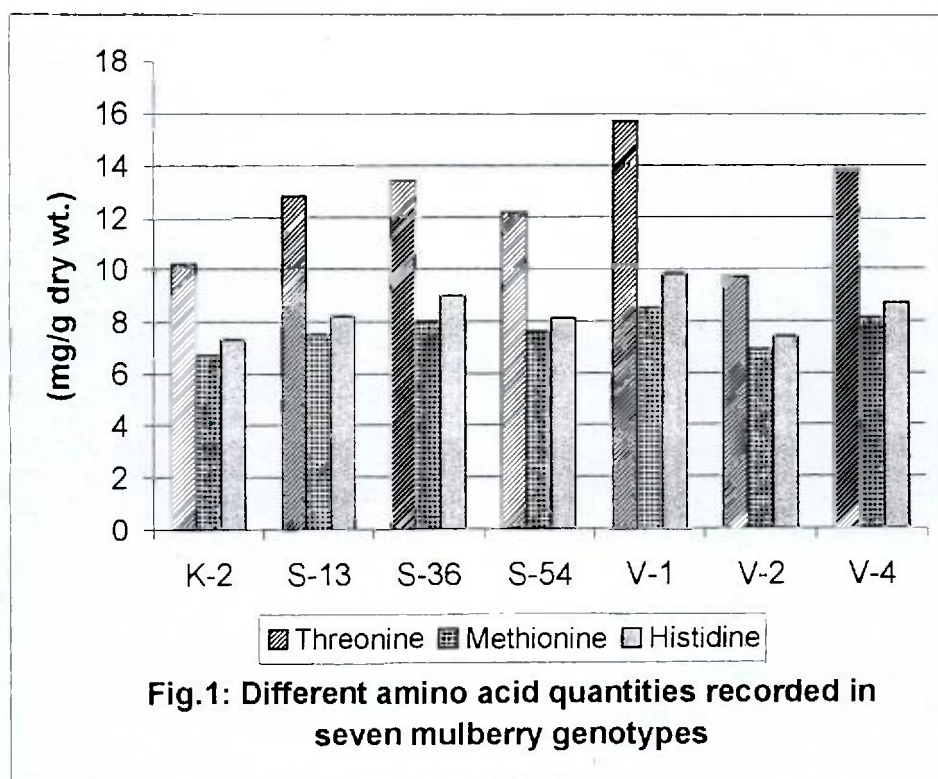


Fig.1: Different amino acid quantities recorded in seven mulberry genotypes

Fig. 1. Different amino acid quantities recorded in seven mulberry genotypes.

Fig. 1. Différentes quantités d'acides aminés enregistrés chez sept génotypes de mûrier.

Nitrate reductase (NR) activity is one of the most important regulatory enzymes in nitrogen metabolism, which catalyzes the reduction of nitrate to nitrite and thus a rate-limiting step in the utilization of nitrate in plants (Deckard *et al.*, 1973). The rate of NR activity suggests the status of nitrogen metabolism of the plant system. Among the seven genotypes, NR activity was found maximum in V-1 (15.4 $\mu\text{gmNo}_2/\text{hr/g}$ fresh wt.), V-4 (13.8 $\mu\text{gmNo}_2/\text{hr/g}$ fresh wt.) and S-36 (12.5 $\mu\text{gmNo}_2/\text{hr/g}$ fresh wt.) while it was minimum in K2 (9.2 $\mu\text{gmNo}_2/\text{hr/g}$ fresh wt.). High NR activity indicates the greater ability of nutrient uptake and increased protein synthesizing capacity in the varieties (Srivastava, 1980). The genotypes, which showed high protein, nitrogen, carbohydrate and total amino acid contents also exhibited high NR activity (Table I). It was reported that NR activity is significantly correlated with leaf protein, leaf yield and other yield attributing characters; therefore, it can be used as an additional parameter for identifying the superior mulberry genotypes (Rao *et al.*, 2000). In the present investigation the genotypes, V-1, V-4 and S-36 besides showing superior leaf quality characters also exhibited higher leaf yield (14.37, 10.67 and 9.45 ton/ha/crop respectively) as compared to other genotypes (Table I).

Silkworm rearing performance:

The leaves from seven different mulberry genotypes were used for bioassay to assess the leaf quality of these genotypes. The average of three seasons rearing data recorded on silkworm growth and cocoon characters were presented in Table II. In general, all the genotypes showed better

performance as compared to K2. Significant differences for larval duration were not observed when the leaves of different genotypes were used. Among the seven genotypes marginal improvement on silkworm growth and cocoon characters were recorded, when the larvae were fed with the leaves of V-1, V-4 and S-36; this clearly indicates the superior leaf quality of these genotypes. Several scientists have reported that there is a significant correlation between the leaf quality and silkworm growth (Bari *et al.*, 1985, Dar *et al.*, 1988, and Sujathamma *et al.*, 2001). Variation in larval weight and economic characters of silkworm was observed when the leaves of different mulberry varieties were used for rearing (Tayade *et al.*, 1988, Karimulla *et al.*, 1989; Sujathamma *et al.*, 2001). Differences in cocoon characters may also occur due to change of seasons (Haque *et al.*, 1990).

An overview of the results revealed that genotypes V-1, V-4 and S-36 exhibited superior performance with regard to different leaf quality traits. These three genotypes showed high protein, nitrogen and amino acid contents in leaves as compared to other genotypes. Further, increased concentration of three amino acids viz., threonine, histidine and methionine in V-1, V-4 and S-36 also confirms superior leaf quality of these genotypes. It was reported that high nitrogen content in leaves together with increased concentration of amino acids like threonine, histidine and methionine leads to higher production efficiency of cocoon shell (PECS) of silkworm (Machii and Katagiri, 1991). High PECS indicate less consumption of leaves with excellent rearing performance (Sarkar and Fujita, 1994). The bioassay with silkworm race PM × NB4D2 also revealed that silkworm growth and cocoon parameters were improved when the leaves of these three genotypes were used during rearing. Therefore, it is concluded from the study that the genotypes V-1, V-4 and S-36 may be utilized effectively in mulberry breeding programme for the development of nutritively superior hybrid genotypes.

REFERENCES

- BARI M.A., ISLAM M., SALAM M.A. (1985) Feeding effects of 3 mulberry varieties on Nistari race of silkworm (*Bombyx mori*). Bangladesh J. Zoo. 13 (1), 13-18.
- BONGALE U.D., CHALUVACHARI, NARAHARI RAO B.V. (1991) Mulberry leaf quality evaluation of its importance. Indian Silk, 39 (8), 51 - 53.
- BONGALE U.D., CHALUVACHARI (1995) Evaluation of eight mulberry germplasm varieties by leaf biochemical and bioassay moulting studies. Sericologia, 35, 83-94
- BOSE P. C., BINDRO B.B. (2001) A comparative biochemical study of seven promising mulberry (*Morus alba* L.) varieties under rainfed conditions of sub-tropical region. Indian J. Seric. 40, 171 - 173.
- CHALUVACHARI, BONGALE U.D. (1995) Evaluation of leaf quality of some germplasm genotypes of mulberry through chemical analysis and bio-assay with silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric. 34 (2), 127 - 132.
- CHALUVACHARI., BONGALE, U.D. (1996) Bioassay moulting response of silkworm *Bombyx mori* L. in relation to leaf nutritive constituents in mulberry (*Morus* spp.) genotypes. Indian J. Seric. 34 (2), 160 - 162.
- DAR H. U., SINGH T.P., DAS B.C. (1988) Evaluation of mulberry varieties by feeding to *Bombyx mori* L. Indian J. Seric. 27(1), 16 - 22.
- DECKARD L., LAMBERT R.J., HAGEMAN R.H. (1973) NR activity in corn leaves as related to yields of grain and grain protein. Crop Sci. 13, 343 - 350.
- DUBIOS M.K., GILLER K.A., HAMILTON K., RELERS P.A., SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar of related substances. Ann. Chem., 28, 350-356.
- FONSECA T. D., DE ALMEIDA J.E., OKAMOTO F., DA CUNHA E.A. (1993) Nutritive value of some mulberry clones (*Morus alba* L.). Sericologia, 33 (4) 631-633.
- GILMOUR (1961) Biochemistry of insect, Academic Press, New York. pp. 1-300.
- HAQUE T., HAQUE K.T. RAHMAN S.M. (1990) Performance of some silkworm races fed on different mulberry cultivars of Bangladesh. Bull Seric, 1, 35- 40.

- HIRATSUKA E. (1917) Researches on the nutrition of the silkworm Shangai Shkenjo Hoko Ku, Tech Bull, 2, 353-412.
- HISCOX J. D., ISRAELSTAM G.F. (1979) A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can. J. Bot. 57, 1332 - 1334.
- HORIE Y. (1978) Quantitative requirement of nutrition for growth of the silkworm. *Bombyx mori* L. JARQ. 12, 211-217.
- HORIE Y. (1980) Recent advances in sericulture. Ann. Rev. Entomol. 25, 49 - 71.
- JACKSON M. L., (1973) Nitrogen determination for soil and plant tissue In: Soil Chemical Analysis, Prentice- Hall of India, Pvt. (Ltd.) New Delhi pp. 183-204
- KARIMULLAH, QUAISEN JAMAL, IQBAL AHMED M., INAYAT AHMED HARIZ, HIGAR ASHIQ M., FSIHAT SHAH M. (1989) Effect of some varieties of mulberry on the development of *Bombyx mori* L. and cocoon quality. Sarhad J. Agric. 5 (5), 489-492.
- KOUL P., TIKKU K., SAXENA B.P. ATAL C.K. (1980) Growth and silk production in *Bombyx mori* fed on 3 different varieties of mulberry (*Morus alba*). Indian J. Seric. 18 (1), 1 - 5.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New Technology on Silkworm rearing. Bulletin Central Sericultural Research Institute, 2, 1-24
- KRISHNASWAMI S. (1978) Mulberry cultivation in south India. Central Silk Board Publication, 1, 1-19
- KRISHNASWAMI S., NOAMANI M.K.R., AHSAN M. (1970) Studies on the quality of mulberry leaves and silkworm cocoon crop production. Part - I Quality differences due to varieties. Indian J. Seric. 9 (1), 1 - 10.
- LI R., SONU Q. (1984) The relationship between quality of mulberry leaves and some economic characters during the later larval stage. Cany Kexue, 10 (4), 197 - 201.
- LOWRI O.H., ROSENBROUGH N. J., FARR A.L., RANDALL R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265- 275.
- MACHII H. (1989) Varietal differences of nitrogen and amino acid contents in mulberry leaves. Acta Sericul. Entomol. 1, 51-61
- MACHII H., KATAGIRI K. (1991) Varietal differences in nutritive values of mulberry leaves for rearing silkworm. JARQ 25, 202 - 208.
- MC CREADY R. M., GUGGOLE J., SILVERIA V., OWENS H.S. (1960) Determination of starch and amylase in vegetables. Application to Peas. Anal Chem. 29, 1156-1158.
- PAUL D. C. SUBBA RAO G., DEB D.C. (1992) Impact of dietary moisture on nutritional indices and growth of *Bombyx mori* and concomitant larval duration. J. Insect Physiol. 38 (3), 229 - 235.
- PRICE G. M. (1963) The effect of anoxia on metabolism in the adult housefly *M. domestica*. Bio. Chem J. 86, 372.
- RAO D.M.R, REDDY M.P., REDDY B.K., SURYANARAYANA N. (2000) Nitrate reductase (NR) activity and its relationship with protein content, leaf yield and its components in mulberry (*Morus* spp.). Indian J. Seric. 39, 86 - 88.
- SARKAR A., FUJITA H. (1994) Better technique for nutritive evaluation of mulberry leaves for silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seri. 33(1), 19 - 22.
- SARKAR A., HAQUE M.R. RAB, M.A., ABSAR N. (1997) Studies on crude protein and amino acid contents of mulberry (*Morus alba* L.) leaves in relation to cocoon production of the Silkworm *Bombyx mori*. Sericologia, 30(1), 17 - 22.
- SASTRY C.R., JOLLY M.S., SUBRAMANYAM M.R., MADHAVA RAO Y.R. (1988) Studies on the varietal differences on the loss of moisture from harvested mulberry leaves. Indian J. Seric. 27 (2), 85 - 91.
- SCOT D.B., NEYRA C.A. (1979) Glutamine synthetase and Nitrate assimilation in sorghum leaves. Can. J. Bot. 57, 754 - 758
- SINHA U.S.P., NEOG K., RAJKHOWA G., CHAKRAVORTHY (2003) Variation in biochemical constituents in relations to maturity of leaves among seven mulberry varieties. Sericologia, 43 (2), 251 - 257.

- SNEDECOR W.G., COCHRAN G.W. (1967) Statistical methods. Oxford and IBH Publications. New Delhi, India 1, 257 – 270.
- SPIES J. R. (1955) Colorimetric procedure for amino acids and phenol In : Methods in Enzymol. Colonic, S.P. and N.P.O. Kaplan (Eds). Vol 3, 461- 477.
- SRIVASTAVA (1980) Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. Phytochemistry, 19, 725 - 753.
- SUJATHAMMA P., DANDIN S.B. (2000) Leaf quality evaluation of mulberry (*Morus* spp.) through chemical analysis. Indian J. Seric. 39, 117 – 121.
- SUJATHAMMA P., DANDIN S.B., SAVITHRI G. (2001) Quality evaluation of mulberry (*Morus* spp.) genotypes through bioassay under Royalseema conditions of Andhra Pradesh. Indian J. Seric. 40 (1) 27 – 34.
- SURYANARAYANA N., SHIVASHANKAR MURTHY, T.C. (2002) Differences in amino acid contents in leaf blades of mulberry (*Morus* spp.) Varieties. Adv. Plant Sci. 15, 475 - 481.
- TAYADE D.S., JAWALE M.D., UNCHEGAONKAR (1988) Evaluation of some improved strains of mulberry by feeding experiment under Marathwada conditions. Indian J. Seric. 27 (2), 92 – 94.
- VIJAYAN K., TIKADER A., DAS K.K., ROY B.N., PAWAN KUMAR T., (1996) Genotypic influence on leaf moisture content and moisture retention capacity in mulberry (*Morus* spp.) Bull. Seri. Res. 7, 95 – 98.
- ZHAO Y. W., BEATON J. D., CAO Z.H., HENDERSON A.M., HU Z.Y., XU C.K. (2001) Relationships between sulphur concentration in mulberry leaves and the quality of silkworm cocoon. Pedosphere. 11 (1), 63 – 66.

CARACTERISATION DE SEPT GENOTYPES DE MURIER PAR RAPPORT A LEUR QUALITE FOLIAIRE ET EVALUATION BIOLOGIQUE AVEC LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

JALAJA S. KUMAR & D. M. RAM RAO

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

Nous avons étudié les caractères de qualité foliaire de sept génotypes de mûrier, c'est-à-dire V-1, V-2, V-4, K-2, S-13, S-36 et S-54 dans des conditions de terrain au CSR&TI de Mysore. On constate que les caractères qualitatifs, l'humidité de la feuille, la rétention de l'humidité (au bout de 6 heures de récolte), la teneur en protéines, en azote, en hydrates de carbone, en acides aminés sont élevés chez V-1, suivi par V-4 et S-36. D'autre part, on constate que ces caractères sont faibles chez V-2 et K-2. Les acides aminés individuels, c'est-à-dire la thréonine, l'histidine, et la méthionine, sont aussi plus élevés chez ces trois génotypes par comparaison aux autres génotypes. L'activité de nitrate réductase (NR) et le rendement foliaire sont élevés chez V-1 suivi par V-4 et S-36, tandis qu'elles sont faibles chez le témoin K2. L'évaluation biologique avec la race de ver à soie PM × NB4D2 révèle aussi que la croissance du ver à soie et les caractères du cocon sont optimums, quand on nourrit les larves avec des feuilles de V-1, V-4 et S-36. L'étude globale révèle que les génotypes V-1, V-4 et S-36 sont supérieurs aux autres génotypes en termes de qualité foliaire, de quantité de feuilles et d'activité des enzymes (NR). On peut donc utiliser ces trois génotypes, comme l'un des parents, dans un programme d'hybridation, pour mettre au point des génotypes de qualité supérieure.

INTRODUCTION

La qualité de la feuille de mûrier (*Morus* spp.) joue un rôle important dans la nutrition du ver à soie (*Bombyx mori* L.), qui à son tour produit des cocons et de la soie. Puisque la production de cocons de bonne qualité dépend de l'apport de feuilles de bonne qualité au ver à soie, la mise au point d'une feuille de qualité supérieure est devenue l'un des objectifs principaux des programmes de lignage chez le mûrier. La qualité de la feuille est influencée par un certain nombre de facteurs tels que la variété, les pratiques culturales, l'incidence des parasites et des maladies ainsi que la méthode de récolte et de conservation des feuilles (Krishnaswami et coll., 1970 ; Koul et coll., 1980 et Sastry et coll., 1988).

De nombreux chercheurs ont étudié l'importance de la qualité foliaire et son influence sur l'élevage du ver à soie (Fonseca et coll., 1993 ; Sarkar et coll., 1997 ; Sujathamma et coll., 2001 et Sinha et coll., 2003). Plusieurs scientifiques ont rapporté que différents caractères qualitatifs, tels que la teneur en humidité, la teneur en azote, la teneur en acides aminés et la teneur en chlorophylle sont responsables de la qualité de la feuille (Bongale et coll. ; 1991 Chaluvachari et Bongale, 1995 et Bose et Bindroo, 2001). Selon certains scientifiques, la combinaison de deux caractères, c'est-à-dire la teneur en azote et en acides aminés totaux, en quantité plus élevée, détermine la qualité foliaire (Machii, 1989 ; Machii et Katagiri, 1991 et Suryanarayana et Shivashankar, 2002). Tous les caractères qualitatifs ou les nutriments pourraient ne pas être disponibles au niveau le plus élevé chez un génotype (Sujathamma et Dandin, 2000), puisque plusieurs facteurs, tels que l'absorption des

nutriments, l'absorption de l'eau, l'efficacité d'utilisation de l'azote etc., sont impliqués et qu'ils diffèrent d'un génotype à l'autre. Il est donc indispensable d'identifier un génotype rassemblant plusieurs caractères qualitatifs importants, cela pourrait permettre d'améliorer la croissance et les caractères du cocon de ver à soie.

Compte tenu de ces éléments, nous avons essayé d'analyser certains des caractères biochimiques importants chez sept génotypes. Nous avons aussi accordé une attention particulière à l'analyse de certains composants individuels importants des acides aminés, la thréonine, l'histidine et la méthionine (Machii et Katagiri, 1991), qui sont liés à la croissance du ver à soie et aux caractères du cocon. De plus, pour évaluer et confirmer la qualité foliaire supérieure de ces génotypes, nous avons réalisé une évaluation biologique avec la race de ver à soie PM × NB4D2.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons réalisé une expérience au *Central Sericultural Research and Training Institute* (CSR&TI) de Mysore, pour étudier les caractères qualitatifs de la feuille de sept génotypes de mûrier, c'est-à-dire, S-13, S-36, S-54, V-1, V-2, V-4 et K2 (témoin). La station de recherche du CSR&TI est située dans la région tropicale du Karnataka, en Inde. Pour l'étude, on cultive de jeunes arbres sains de tous les génotypes et on transplante 1400 jeunes arbres sur le terrain principal avec un espacement de 90 × 90 cm. L'expérience est disposée selon une conception aléatoire en utilisant 50 jeunes arbres / répétition ; on maintient quatre répétitions de ce type pour chaque génotype. On procède aux opérations culturales, et aux applications de fumier de ferme et d'engrais d'après les normes recommandées du CSR&TI, de Mysore (Krishnaswami, 1978). On procède à cinq récoltes tous les 65 – 70 jours de croissance des cultures, et on détermine les paramètres qualitatifs de la feuille chez les feuilles mûres (12 à 14^{ème} feuille à partir de l'extrémité de la pousse)

On estime les caractères qualitatifs de la feuille tels que la teneur en eau de la feuille, la capacité de rétention de l'eau (au bout de 6 heures de récolte), en suivant la méthode de Vijayan et coll., (1996). On analyse la teneur totale en chlorophylle en adoptant la méthode d'Hiscox et d'Israelstam (1979). On estime l'activité de la nitrate- réductase en suivant la méthode de Scot et Neyra (1979). De plus, une fois recueillis, les échantillons de feuilles mûres, sont séchés et utilisés pour analyser la teneur en protéines (Lowry et coll., 1951), la teneur totale en acides aminés en suivant la méthode à la ninhydrine (Spies, 1955), en utilisant la leucine comme standard et on estime la teneur totale en azote en suivant la méthode micro-kjeldhal (Jackson, 1973). On analyse la teneur en amidon et en sucres (hydrates de carbone solubles) d'après respectivement la méthode de Mc Cready (1960) et de Dubios et coll., (1956). On estime aussi certains acides aminés individuels, c'est-à-dire la thréonine, l'histidine et la méthionine dans les feuilles en adoptant la méthode de Price (1963). On répète l'expérience trois fois et on calcule les données moyennes pour les différents caractères qualitatifs de la feuille et on les analyse sur le plan statistique (Snedecor et Cochran, 1967). On sélectionne vingt plants au hasard par répétition chez chacun des sept génotypes, 70 jours après la taille, et on enregistre les données sur le rendement foliaire / plant, que l'on convertit plus tard en tonnes / ha / récolte.

De plus, pour identifier les génotypes dont les caractères foliaires sont supérieurs, on procède à une évaluation biologique avec la race de ver à soie hybride PM × NB4D2 pendant trois saisons différentes. On procède à l'élevage en suivant les technologies d'élevage du ver à soie (Krisnaswami, 1978). On recueille les feuilles de mûrier dans les répétitions pour chacun des sept génotypes et on les utilise pour nourrir les vers à soie jusqu'au filage. On enregistre les données moyennes pendant trois saisons sur la croissance larvaire et les caractères du cocon, tels que la durée larvaire, le poids de 10 larves mûres (g), le rendement / 10 000 larves (en nombre), le rendement / 10 000 larves (en poids), le poids du cocon (g), le poids d'une coque (g), la richesse soyeuse (%) et on les analyse sur le plan statistique (Snedecor et Cochran, 1967).

RESULTATS ET DISCUSSION

Caractères qualitatifs de la feuille :

L'analyse les caractères qualitatifs importants de la feuille, c'est-à-dire, la teneur en protéines, en azote, en hydrates de carbone, en acides aminés, en chlorophylle et en humidité dans les feuilles mûres de sept génotypes de mûrier est présentée dans le Tableau I.

En général, tous les génotypes présentent une meilleure performance en matière de qualité de la feuille que K2. L'un des caractères qualitatifs les plus importants est la teneur en eau de la feuille, qui maintient les niveaux nutritifs des feuilles et à son tour améliore la saveur des feuilles pour le ver à soie. L'humidité de la feuille est un caractère génétique influencé par l'humidité du sol et la nature de la prolifération des racines d'une variété (Sujathamma et Dandin, 2000). Dans cette étude, la teneur en eau de la feuille (LMC) et la capacité de rétention de l'eau (MRC) estimées s'avèrent les plus élevées chez V-1 (75,93 % et 82,17 %), suivie par V4 (75,67 % et 81,64 %) et S36 (75,14 % et 81,27 %), tandis que ces deux caractères s'avèrent les plus faibles chez K2 (69,50 % et 76,25 %). Les feuilles caractérisées par des LMC et des MRC plus élevées sont considérées comme des feuilles de qualité supérieure (Bongale et Chaluvachari, 1995). Ces deux caractères sont aussi étroitement associés avec l'efficacité d'alimentation et avec le taux de croissance des larves de ver à soie (Paul et coll., 1992 et Chaluvachari et Bongale, 1995). La teneur totale en chlorophylle est la plus élevée chez S-13 (3,35 mg / g de poids frais), V-1 (3,24 mg / g de poids frais) et V-4 (3,12 mg / g de poids frais), tandis qu'elle est la plus faible chez S-36 (2,55 mg / g de poids frais). La teneur plus élevée en chlorophylle dans la feuille indique l'efficacité photosynthétique ; on peut donc l'utiliser comme l'un des critères pour quantifier le taux photosynthétique chez le mûrier (Sujathamma et Dandin, 2000). La teneur en protéine est un autre caractère qualitatif important de la feuille ; son niveau alimentaire optimum devrait être de 20 à 25 %, pour la croissance optimale des larves de ver à soie (Horie, 1980). Parmi les sept génotypes, la teneur totale en protéines est la plus élevée chez V-1 (24,56 %), suivie par S-36 (23,89 %) et V-4 (22,67 %) tandis qu'elle est la plus faible chez K2 (18,34 %). La teneur plus élevée en protéines dans la feuille est étroitement associée à une humidité et à une capacité de rétention de l'humidité plus importantes dans les feuilles et elle favorise le poids de la larve et le ratio de mue pendant la 2^{ème} mue (Chaluvachari et Bongale, 1996). On a aussi rapporté que de faibles LMC et teneur en protéines des feuilles ont un effet sur le taux de croissance de la larve et sur le poids du cocon (Li et Sonu, 1984). D'autre part, selon Machii et Katagiri (1991) l'augmentation de la teneur en protéines au-delà du niveau optimal dans les feuilles de mûrier entraîne une amélioration marginale de la productivité de cocons. Les hydrates de carbone sont disponibles en grande quantité dans les feuilles de mûrier (Hiratsuka, 1917) et on a rapporté qu'ils sont la principale source d'énergie pour le ver à soie (Horie, 1978). On estime les hydrates de carbone d'après la quantité de sucre et la teneur en amidon disponibles dans les feuilles (Bose et Bindroo, 2001). Dans cette étude, ces deux caractères sont les plus élevés chez V-1 (14,98 % et 12,23 %) et V4 (13,76 % et 11,27 %), tandis qu'ils sont faibles chez le témoin K2 (12,76 % et 10,52 %). Si les feuilles ont une teneur élevée en hydrates de carbone, les vers à soie disposent de plus d'énergie et cela peut améliorer la synthèse des protéines de soie.

La teneur en azote total et en acides aminés sont deux facteurs importants qui déterminent la qualité de la feuille (Machii, 1989). Parmi les génotypes, on n'observe pas de différence significative pour ces deux caractères, cependant, on enregistre une légère amélioration chez V-1 (4,25 % et 327,7 mg / g de poids sec), V4 (4,07 % et 314,7 mg / g de poids sec) et S-36 (4,18 % et 302,6 mg / g de poids sec) par comparaison au témoin K2 (3,14 % et 260,2 mg / g de poids sec). On a rapporté que les variétés qui possèdent une teneur élevée en azote et en acides aminés dans leurs feuilles, sont supérieures sur le plan nutritionnel et elles promeuvent la croissance et le développement du ver à soie (Machii et Katagiri, 1991 ; Suryanarayana et Shivashankar, 2002). Une teneur plus élevée en acides aminés et en protéines est d'une importance particulière pour les larves de vers à soie, en raison

de leur utilisation active pour la synthèse des protéines de la soie (Sujathamma et Dandin 2000). On a estimé certains des composants individuels importants des acides aminés, c'est-à-dire la thréonine, l'histidine et la méthionine, qui sont plus liées à la croissance du ver à soie (Machii, 1989) dans les feuilles mûres et on observe une variation chez les différents génotypes. Parmi les sept génotypes, ces acides aminés s'avèrent élevés chez V-1, suivie par S-36 et V-4, tandis que ces acides aminés sont faibles chez V-2 et K2 (Fig. 1). La présence d'une concentration plus élevée en histidine et en méthionine contribue à de meilleurs croissance et développement du ver à soie et l'augmentation de la concentration en thréonine améliore la synthèse des protéines de la soie (Machii et Katagiri, 1991). Selon Gilmour (1961), la méthionine, un acide aminé contenant du soufre, sert de source des groupements sulphydryles, qui sont responsables de la synthèse des coenzymes et des hormones chez le ver à soie. L'augmentation du niveau de méthionine chez V-1, V-4 et S-36 indique que les feuilles pourraient contenir une concentration plus élevée en soufre par comparaison aux autres génotypes. Zhao et coll., (2001) ont rapporté une relation significative entre la concentration en soufre dans les feuilles de mûrier et les caractères qualitatifs du cocon.

La nitratre réductase (NR) est l'une des enzymes régulatrices les plus importantes dans le métabolisme de l'azote, qui catalyse la réduction de nitratre en nitrite et donc une étape qui limite le taux d'utilisation du nitratre chez les plantes (Deckard et coll., 1973). Le taux d'activité NR suggère l'état de métabolisme de l'azote du système de la plante. Parmi les sept génotypes, l'activité NR s'avère maximum chez V-1 (15,4 $\mu\text{g No } 2 / \text{h} / \text{g}$ de poids frais), V-4 (13,8 $\mu\text{g No } 2 / \text{h} / \text{g}$ de poids frais) et S-36 (12,5 $\mu\text{g No } 2 / \text{h} / \text{g}$ de poids frais) tandis qu'elle est minimum chez K2 (9,2 $\mu\text{g No } 2 / \text{h} / \text{g}$ de poids frais). Une activité NR élevée indique une capacité plus grande d'absorption des nutriments et une augmentation de la capacité de synthèse des protéines chez les variétés (Srivastava, 1980). Les génotypes, qui présentent une teneur élevée en protéines, en azote, en hydrates de carbone et en acides aminés présentent aussi une activité NR élevée (Tableau I). On a rapporté que l'activité NR est corrélée de manière significative avec les protéines de la feuille, le rendement foliaire et d'autres caractères liés au rendement ; on peut donc l'utiliser comme un paramètre supplémentaire pour identifier les génotypes de mûrier supérieurs (Rao et coll., 2000). Dans cette étude, les génotypes, V-1, V-4 et S-36 tout en montrant des caractères supérieurs pour la qualité de la feuille, présentent aussi un rendement foliaire plus élevé (14,37 ; 10,67 et 9,45 tonnes / ha / récolte respectivement) par comparaison aux autres génotypes (Tableau I).

Performance d'élevage du ver à soie :

On utilise les feuilles de sept génotypes différents, dans le cadre de l'évaluation biologique, pour estimer la qualité de la feuille de ces génotypes. Les moyennes des données enregistrées, pendant trois années d'élevage sur la croissance du ver à soie et sur les caractères du cocon sont présentées dans le Tableau II. En général, tous les génotypes présentent une meilleure performance que K2. On n'observe pas de différence significative concernant la durée larvaire, quand on utilise les feuilles des différents génotypes. Parmi les sept génotypes, on observe une amélioration marginale concernant la croissance du ver à soie et les caractères du cocon, quand on nourrit les larves avec les feuilles de V-1, V-4 et S-36 ; cela indique clairement la qualité supérieure de la feuille de ces génotypes. Plusieurs scientifiques ont rapporté qu'il y a une corrélation significative entre la qualité de la feuille et la croissance du ver à soie (Barie et coll., 1985, Dar et coll., 1988 et Sujathamma et coll., 2001). On a observé une variation du poids larvaire et des caractères économiques du ver à soie, quand on utilise les feuilles de différentes variétés de mûrier pour l'élevage (Tayade et coll., 1988, Karimulla et coll., 1989 ; Sujathamma et coll., 2001). Il pourrait aussi se produire des différences pour les caractères du cocon à cause des changements de saison (Haque et coll., 1990).

L'étude globale des résultats révèle que la performance des génotypes V-1, V-4 et S-36 est supérieure pour les différents caractères qualitatifs de la feuille. Ces trois génotypes présentent une teneur élevée en protéines, en azote, et en acides aminés dans les feuilles par comparaison aux autres génotypes. De plus, l'augmentation de la concentration en trois acides aminés, c'est-à-dire la

thréonine, l'histidine et la méthionine chez V-1, V-4 et S-36 confirme aussi la qualité foliaire supérieure de ces génotypes. On a rapporté qu'une teneur élevée en azote dans les feuilles, avec l'augmentation de la concentration en acides aminés tels que la thréonine, l'histidine et la méthionine entraîne une efficacité de production de coques soyeuses du ver à soie (PECS) plus élevée (Machii et Katagiri, 1991). Une PECS élevée indique une consommation moins importante de feuilles avec une excellente performance d'élevage (Sarkar et Fujita, 1994). L'évaluation biologique avec la race de ver à soie PM × NB4D2 révèle aussi que la croissance du ver à soie et les paramètres du cocon sont meilleurs quand on utilise les feuilles de ces trois génotypes pendant l'élevage. D'après l'étude, on peut donc conclure, qu'on pourrait utiliser efficacement les génotypes V1-, V-4 et S-36 dans les programmes de lignage du mûrier, pour la mise au point de génotypes hybrides supérieurs sur le plan nutritif.

EFFECT OF COMPOSTS ENRICHED WITH USEFUL/ ANTAGONISTIC MICROBES ON SUPPRESSION OF NURSERY DISEASES IN MULBERRY

D. D. SHARMA, MALA V. R., P. K. DAS & S. B. DANDIN

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

Studies were conducted in mulberry to find out the effect of compost prepared by seri residue (SR; silkworm litter + rearing waste) and vermicompost (VMC) enriched with Rock phosphate (RP), Phosphate solubilizing bacteria (PSB), *Azotobacter* (Az), *Trichoderma harzianum* (Th) and *T. pseudokoningii* (Tp) on suppression of nursery diseases (stem-canker, cutting rot, bud blight, collar rot and die-back) in terms of sprouting of cuttings and survival of saplings. Among the different enriched composts, the maximum sprouting of cuttings and survival of plants were observed in SR enriched with RP+Az+PSB+Th+Tp and VMC enriched with RP+Az+PSB+Th+Tp. The increase in sprouting and survival percentages in the two treatments was 25.5 & 21.1 and 26.6 and 21.7, respectively over the control (soil with pathogens load only). The values recorded, were significantly lesser than that of recommended method [Mancozeb +Nursery Guard (*T. pseudokoningii*)]. To achieve the equal or significantly higher values than that of the recommended method, the effective treatments were integrated with neem oil cake. Results revealed that SR and VMC enriched with RP+Az+PSB+Th+Tp after mixing with neem oil cake (2:1; @ 2 kg/m²) improved the sprouting by 41.7 & 37.5 % and survival to an extent of 45.4 & 40.9 %, respectively over the control and on par with that of the recommended method (sprouting - 43.1 % and survival - 46.4 %). The failure of sprouting in all the treatments was due to the attack of diseases like cutting rot, stem canker and bud blight. The death of saplings occurred due to the collar rot and die-back. Thus, the seri/vermi compost enriched with useful/antagonistic microbes after mixing with neem oil cake (2:1) @ 2 kg/m² in nursery bed can be used for improving the sprouting and survival of cuttings up to 45.4 % over the control and the package is ecofriendly besides improving the soil health.

Keywords: Mulberry, enriched compost, nursery diseases, *Trichoderma pseudokoningii*.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.), the sole host plant of silkworms (*Bombyx mori* L.), is a perennial crop propagated through cuttings. During multiplication in the nursery, the cuttings are exposed to the infection of several soilborne diseases viz., stem-canker (*Botryodiplodia theobromae*), cutting rot (*Fusarium solani*), bud blight (*Fusarium lateritium* var. *mori*) collar rot (*Phoma sorghina*) and die-back (*B. theobromae*) causing mortality of saplings up to 35 % (Gupta *et al.*, 1997). For controlling these diseases, an integrated technology was developed involving the dipping of cuttings in Dithane M-45 (0.1%) solution and application of bioformulation viz., Nursery-Guard developed by *Trichoderma pseudokoningii*, which enhances the survivability up to 45.0 % over the control (Gupta and Sarkar, 1999; Sharma *et al.*, 2003). The continuous application of chemical fertilizers and use of fungicides for the control of diseases is deteriorating the soil health and polluting the environment. During the course of mulberry cultivation and rearing of silkworms, enormous amount of farm and rearing residue is generated which is being converted into seri & vermi composts using suitable

technologies for maintaining the soil health (Bhogesha *et al.*, 2005 a). These composts after enriching with useful (PSB and *Azotobacter*) and antagonistic (*T. harzianum* and *T. pseudokoningii*) microbes are being used to reduce the use of chemical fertilizers in mulberry cultivation (Bhogesha *et al.*, 2005 b). Various workers have reported that compost enriched with PSB, *Azotobacter*, *T. harzianum*, *T. viride*, *Paecilomyces* sp., *Verticillium tenuipis*, etc. has contributed greatly for management of various soilborne diseases in certain horticultural and agricultural crops besides improving the soil fertility (Hoitink and Kuter, 1984; Subbarao *et al.*, 1992; Miller, 1992; Manna and Ganguly, 1999; Khan and Khan, 2001). With a view of integrating the disease management technology along with agronomical package to reduce labour and cost and also to improve the soil health, the present study was undertaken in mulberry to find out the effect of compost prepared by seri residue and vermicompost enriched with Rock phosphate, useful/antagonistic microbes viz., Phosphate solubilizing bacteria, *Azotobacter*, *Trichoderma harzianum* and *T. pseudokoningii* on suppression of nursery diseases.

MATERIALS AND METHODS

(i) Preliminary screening of enriched composts on sprouting and survivability of cuttings:

The preliminary screening was conducted to know the effect of compost prepared by seri residue [(SR) silkworm litter + rearing waste] and vermicompost (VMC) enriched with Rock phosphate (RP), useful [Phosphate solubilizing bacteria (PSB) & *Azotobacter* (Az)] and antagonistic [*T. harzianum* (Th) and *T. pseudokoningii* (Tp)] microbes on suppression of nursery diseases. RP @ 50 kg/MT was added to waste before decomposition. After 4 months, the carrier based product of *Azotobacter*, PSB and bioagents were mixed @ 2 kg/Metric tonnes in SR/ VMC (Bhogesha *et al.*, 2005a). After one month, the different enriched composts were used for conducting the experiment. The experiment was conducted in Randomized Block Design with 10 treatments including control (soil with pathogens load only) and recommended method [Mancozeb + Nursery Guard (*T. pseudokoningii*)]. Each treatment was in 1 m² area of nursery replicated 3 times. The mixed inoculum of pathogens causing nursery diseases was used @ 500 g/ sub-plot (4.7 × 10⁷ spores/g). After 15 days, enriched compost was broadcasted in nursery beds @ 2 kg/m² and mixed well in soil. V-1 a high yielding mulberry variety susceptible to nursery diseases was selected for the study. 100 stem-cuttings/sub-plot were planted as per the nursery package with regular irrigation (Dandin *et al.*, 2003). Dykes were raised between sub plots to minimize the inter plot interference. Data on sprouting of cuttings (30th day) and survival of saplings (90th day) were collected. Dead cuttings and saplings were examined for the symptoms of soilborne nursery diseases of mulberry viz., stem canker, cutting rot, bud blight, collar rot and die-back. Percent disease incidence was calculated by the formula.

$$\text{Disease incidence (\%)} = \frac{\text{Number of dead cuttings}}{\text{Total cutting planted}} \times 100$$

Recommended method was selected as one of the treatments to know the effectiveness of enriched composts on suppression of nursery diseases in terms of sprouting and survival of cuttings for selecting the best enriched compost treatment(s) to achieve the target on par or more than the recommended method.

(ii) Testing of effective treatments on sprouting and survivability of cuttings:

The effective treatments of preliminary screening were tested along with neem oil cake [obtained from seeds of neem (*Azadirachta indica* L.) after extraction of oil] as it is found to be effective in controlling the various soilborne diseases in mulberry (Sharma *et al.*, 2003). The experiment was conducted in sick soil having the spore load of 2.9 × 10⁷/g soil in RBD with 7 treatments comprising of 4 effective treatments of enriched composts, neem oil cake, control (soil with pathogens load only)

and recommended method. Each treatment was 5 m² nursery bed with 3 replications. Enriched compost was broadcasted after mixing with neem oil cake (2:1) @ 2 kg/m² in nursery beds and incorporated in soil. 500 cuttings of V-1 variety were planted in each sub-plot followed by irrigation. Data on sprouting, survival and diseased cuttings/ saplings were collected.

RESULTS

(i) Preliminary screening of enriched composts on sprouting and survivability of cuttings:

All the treatments of compost prepared by SR and VMC enriched with useful/ antagonistic microbes increased sprouting of cuttings (1.1 – 25.4 %) and survivability of saplings (1.7 – 26.6 %) over the control (soil with pathogens load only). But maximum sprouting (25.4 %) and survival (26.6 %) were observed in T-4 (SR enriched with RP+Az+PSB+Th+Tp) followed by T-8 (VMC enriched with RP+Az+PSB+Th+Tp) with increased sprouting and survival of 21.1 and 21.7 %, respectively. The next best treatments were T-3 (SR enriched with RP+Th+Tp) and T-7 (VMC enriched with RP+Th+Tp), which increased the sprouting and survivability from 17.8 – 20.0 %. There were no significant differences among these three treatments (Table I). However, the above values were significantly lesser than that of recommended method. The failure of sprouting in all the treatments was due to the attack of soilborne nursery diseases like cutting rot, stem canker and bud blight. The death of saplings occurred due to the collar rot and die-back (Table II). The three effective enriched compost treatments (T-4, T-8 and T-7) were selected for final screening.

(ii) Testing of effective treatment(s) on sprouting and survivability of cuttings:

SR & VMC enriched with RP+Az+PSB+Th+Tp after mixing with neem oil cake increased the sprouting by 41.7 & 37.5 % and survival to an extent of 45.4 & 40.9 %, respectively over the control (Table III). These values were on par with that of the recommended method (sprouting - 43.1 % & survivability- 46.4 %). In different treatments, the severity of cutting rot was very high followed by stem canker, bud blight, collar rot and die-back (Tables II & IV).

DISCUSSION

In the present study, the maximum improvement in sprouting of cuttings and sapling survivability in SR & VMC enriched with RP+Az+PSB+Th+Tp after mixing with neem oil cake may be attributed to the complementary effect of *Azotobacter*, PSB, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* and neem oil cake. Due to this, the pathogens causing nursery diseases like *B. theobromae*, *F. solani*, *F. lateritium* var. *mori* and *Phoma sorghina* were suppressed thereby protecting the cuttings from the attack of the diseases. Neem oil cake reduces the pathogen load in soil by production of toxic substances such as nimbidin, thionemone and phenolics, which are toxic to soilborne pathogens (Alam, 1993) while the species of *Trichoderma* inhibit the growth of pathogens through hyper-parasitism, competition and antibiosis. During antibiosis, the *Trichoderma* is also known to produce hydrolytic enzymes and antifungal compounds like chitinases, trichodermin and gluconase, which dissolve the cell wall of the pathogenic fungi arresting the growth (Tronsmo, 1996). *Azotobacter* is able to produce growth hormones and vitamins viz., gibberellin, biotin, nicotinic acid etc., which help in inducing resistance in mulberry against certain pathogens (Subbarao *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 1994). Phosphate solubilizing bacteria produce toxic metabolites like bulbiformin, phenazin, organic acids, siderophores, etc., which help in decreasing the infection of soilborne pathogens (Dalla, 1986).

Gupta and Sarkar (1999) have observed that stem canker, cutting rot, bud blight, collar rot and die-back are the major soilborne diseases during initial establishment of mulberry plantation. They reported that the application of biofungicide, Nursery-Guard (*T. pseudokoningii*) enhances the sprouting of cuttings and survivability of saplings to an extent of 45 %, besides improving the root and shoot growth of saplings.

Table I. Preliminary screening of microbially enriched composts on sprouting and survivability of mulberry (variety V-1) during nursery plantation.

Tableau I. Evaluation préliminaire de composts enrichis avec des microbes par rapport au bourgeonnement et à la capacité de survie des mûriers (variété V-1) pendant la plantation en pépinière.

Sl. No.	Treatments	Sprouting of cuttings (%) (30 DAP)	Increase over control (%)	Survival of plant (%) (90 DAP)	Increase over control (%)
No. Traitements de série		Bourgeonnement des boutures (30 JAP) (%)	Augmentation par rapport au témoin (%)	Survie des plants au bout de 90 JAP (%)	Augmentation par rapport au témoin (%)
T-0	Control (pathogens load only) <i>Témoin (Charge de pathogènes seulement)</i>	63.5	-	60.0	-
T-1	Seri residue (SR: without enrichment) <i>Résidu Seri (RS sans enrichissement)</i>	64.7	1.9	61.2	2.0
T-2	SR enriched with RP + Az + PSB <i>RS enrichis avec RP + Az + PSB</i>	69.6	9.6	66.0	10.0
T-3	SR enriched with RP + Th + Tp <i>RS enrichis avec RP + Th + Tp</i>	75.2	18.4	72.0	20.0
T-4	SR enriched with RP + Az+ PSB+Th+Tp <i>RS enrichis avec RP + Az+ PSB+Th+Tp</i>	79.6	25.4	76.0	26.6
T-5	Vermi compost (VMC: without enrichment) <i>Vermicompost (VMC sans enrichissement)</i>	64.2	1.1	61.0	1.7
T-6	VMC enriched with RP + Az + PSB <i>VMC enrichis avec RP + Az + PSB</i>	68.0	7.1	65.0	8.3
T-7	VMC enriched with RP + Th + Tp <i>VMC enrichis avec RP + Th + Tp</i>	74.8	17.8	71.5	19.1
T-8	VMC enriched with RP + Az+ PSB +Th +Tp <i>VMC enrichis avec RP + Az+ PSB +Th +Tp</i>	76.9	21.1	73.0	21.7
T-9	Recommended method (Mancozeb + NG) <i>Méthode recommandée (Mancozeb + NG)</i>	90.2	42.0	87.3	45.5
	SE±	1.69	—	1.63	—
	CD at 5%	5.05	—	4.90	—
	CV %	6.13	—	6.76	—

PSB = Phosphate solubilizing bacteria / *Bactéries solubilisant le phosphate* ; RP = Rock phosphate / *Phosphate de roche* ; Az = *Azotobacter*; Th = *Trichoderma harzianum*; Tp = *T. pseudokoningii*; NG = Nursery Guard (*T. pseudokoningii*); DAP / JAP : Days after plantation / *Nbre de jours après la plantation*.

Table II. Data on cuttings affected by different diseases during nursery plantation in microbially enriched seri and vermi composts.**Tableau II. Données sur les boutures affectées par différentes maladies dans la pépinière dans des seri et vermi composts enrichis de microbes.**

Sl. No.	Treatments	Total failure of cuttings (%)	Cuttings affected by nursery diseases (%)				
			During sprouting (30 DAP)			Survival (90 DAP)	
			Cutting rot	Stem canker	Bud blight	Collar rot	Die back
<i>Boutures affectées par les maladies des pépinières (%)</i>							
No. de série	Traitements	% total d'échec des boutures	Pendant le bourgeonnement (30 JAP)			Survie (90 JAP)	
			Pourriture des boutures	Chancres de la tige	Flétrissure du bourgeon	Pourriture du collet	Dépérissement
T-0	Control (pathogens load only) <i>Témoin (Charge seulement en pathogènes)</i>	40.0	19.2	10.3	7.0	2.0	1.5
T-1	Seri residue (SR without enrichment) <i>Résidus séricicoles (RS sans enrichissement)</i>	38.8	17.5	10.0	7.8	2.2	1.3
T-2	SR enriched with / <i>RS enrichis avec</i> RP + Az + PSB	34.0	12.8	10.6	7.0	2.0	1.6
T-3	SR enriched with / <i>RS enrichis avec</i> RP + Th + Tp	28.0	10.0	8.0	6.8	1.8	1.4
T-4	SR enriched with RP + Az+ PSB+Th+Tp <i>RS enrichis avec RP + Az + PSB + Th + Tp</i>	24.0	10.6	6.5	3.3	2.0	1.6
T-5	Vermi compost (VMC: without enrichment) <i>Vermi compost (VMC sans enrichissement)</i>	39.0	16.8	10.5	8.5	1.9	1.3
T-6	VMC enriched with RP + Az + PSB <i>VMC enrichis avec RP + Az + PSB</i>	35.0	12.0	11.0	9.0	1.6	1.4
T-7	VMC enriched with / <i>VMC enrichis avec</i> RP + Th + Tp	28.5	10.2	8.5	6.5	2.0	1.3
T-8	VMC enriched with RP + Az+ PSB +Th +Tp <i>VMC enrichis avec RP + Az + PSB + Th +Tp</i>	27.0	9.0	7.5	6.6	2.4	1.5
T-9	Recommended method (Mancozeb + NG) <i>Méthode recommandée (Mancozeb + NG)</i>	12.7	3.8	3.2	2.8	1.7	1.2
	SE±	-	0.20	0.11	0.09	0.04	0.03
	CD at 5%	-	0.55	0.30	0.26	0.13	0.10
	CV %	-	9.05	8.56	7.42	7.23	6.13

Table III. Combined effect of microbially enriched composts and neem oil cake on sprouting and survivability of mulberry (variety V-1) during nursery plantation.

Tableau III. Effet combiné de composts enrichis de microbes et du tourteau de margousier sur le bourgeonnement et la capacité de survie du mûrier (variété V-1) pendant la plantation en pépinière.

Sl. No.	Treatments	Sprouting of cuttings (%) (30 DAP)	Increase over control (%)	Survival of cuttings (%) (90 DAP)	Increase over control (%)
No. Traitements de série		% de bourgeonnement des boutures (30 JAP)	Augmentation par rapport au témoin (%)	Survie des boutures en % (90 JAP)	Augmentation par rapport au témoin (%)
T-0	Control (pathogens load only) <i>Témoin (Charge de pathogènes seulement)</i>	64.6	-	60.8	-
T-1	Neem oil cake (NOC) only <i>Tourteau de margousier (NOC) seulement</i>	74.8	15.8	72.0	18.4
T-2	Seri residue (SR) enriched with Th + Tp+NOC <i>Résidu séricicoles (RS) enrichis avec Th + Tp + NOC</i>	80.5	24.6	77.0	26.6
T-3	Vermi compost (VMC) enriched with Th + Tp+NOC <i>Vermicompost (VMC) enrichi avec Th + Tp + NOC</i>	77.8	20.4	74.9	23.2
T-4	SR enriched with RP + Az+PSB+Th +Tp +NOC <i>RS enrichi avec RP + Az+PSB+Th +Tp+NOC</i>	91.6	41.7	88.4	45.4
T-5	VMC enriched with RP+Az+ PSB + Th+ Tp+ NOC <i>VMC enrichi avec RP+Az+ PSB+Th+Tp+NOC</i>	88.8	37.5	85.6	40.9
T-6	Recommended method (Mancozeb + NG) <i>Méthode recommandée (Mancozeb + NG)</i>	92.5	43.1	89.0	46.4
	SE±	1.39	—	1.32	—
	CD at 5%	3.90	—	3.68	—
	CV %	7.01	—	6.48	—

The results of present study are in conformity with the findings of Hoitink and Kuter (1984) who reported that compost prepared from tree barks enriched with *Trichoderma* spp. enhances the population levels of biocontrol agents and thus helps in suppressing the soilborne pathogens. Khan and Khan (2001) reported that application of PSB decreased the severity of tomato wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by 23-49 %.

Table IV. Data on cuttings affected by different diseases during nursery plantation in microbially enriched composts after mixing with neem oil cake.

Tableau IV. Données sur les boutures affectées par différentes maladies dans la pépinière dans des composts enrichis de microbes mélangés avec des tourteaux de margousier.

Sl. No.	Treatments	Total failure of cuttings (%)	Cuttings affected by nursery diseases (%)				
			Sprouting (30 DAP)			Survival (90 DAP)	
			Cutting rot	Stem canker	Bud blight	Collar rot	Die back
<i>Boutures affectées par les maladies de pépinière (%)</i>							
No. de série	Traitements	% d'échec total des boutures	Bourgeonnement (30 JAP)			Survie (90 JAP)	
			Pourriture des boutures	Chancre de la tige	Flétrissure du bourgeon	Pourriture du collet	Dépérissement
T-0	Control (pathogens load only) <i>Témoin (charge de pathogène seulement)</i>	39.2	18.6	10.4	6.4	2.0	1.8
T-1	Neem oil cake (NOC) only <i>Tourteau de margousier (NOC) seulement</i>	28.0	12.5	8.6	4.1	1.6	1.2
T-2	Seri residue (SR) enriched with Th + Tp+NOC <i>Résidus Seri (RS) enrichis avec Th + Tp+NOC</i>	23.0	9.6	6.5	3.5	2.2	1.3
T-3	Vermi compost (VMC) enriched with Th+Tp+NOC <i>Vermicompost (VMC) enrichi avec Th+Tp+NOC</i>	25.1	10.2	8.2	3.8	1.6	1.3
T-4	SR enriched with RP + Az +PSB + Th +Tp + NOC <i>RS enrichi avec RP + Az + PSB + Th + Tp + NOC</i>	11.6	3.8	2.5	2.1	1.6	1.6
T-5	VMC enriched with RP +Az + PSB + Th +Tp + NOC <i>VMC enrichi avec RP + Az + PSB + Th + Tp + NOC</i>	14.4	4.3	4.0	2.9	1.8	1.4
T-6	Recommended method (Mancozeb + NG) <i>Méthode recommandée (Mancozeb + NG)</i>	11.0	3.6	2.1	1.8	1.9	1.6
	SE±	—	1.00	0.75	0.46	0.18	0.11
	CD at 5%	—	2.80	2.10	1.30	0.52	0.32
	CV %	—	8.7	10.0	9.8	10.7	8.0

The present study has indicated that for reducing the incidence of soilborne diseases in the nursery and to improve the sapling recovery, compost prepared by seri residue/vermicompost enriched with Rock Phosphate + *Azotobacter* + Phosphate solubilizing bacteria + species of *Trichoderma* after mixing with neem oil cake (2:1) @ 2 kg/m² in nursery bed can be used. The package is ecofriendly besides improving the soil and sapling health.

REFERENCES

- ALAM M. M. (1993) Bioactivity against phytonematodes. In: RANDHAWA N. S. & PARMAR B. S. (eds.) *Neem Research & Development*. Society of Pesticide Science, India, pp.123-143.
- BHOGESHA K., DAS P. K., VEDAVYASA K., CHOWDARY N. B. & RAJANNA L. (2005 a) Evaluation of different methods of composting by recycling seri farm residues (Lead Paper). In: National Seminar on Composting and Vermicomposting held at CSRTI, Mysore (26 to 27 October), pp. 111-115.
- BHOGESHA K., DAS P. K., CHOWDARY N. B. & VEDAVYASA K. (2005 b) Fortification of seri cultural compost and its effect on mulberry production. In: *Annual Report (2005-06)*, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, pp. 21-22.
- DALLA G. C. (1986) Experience di lotta biologica contro fusariosi vascolare del garofano (Trials on the biological control of vascular wilt of carnations). *Annali dell Istituto Sperimentale per la Floricoltura*, 17, 3012.
- DANDIN S. B., JAYASWAL J. & GIRIDHAR K. (2003) *Hand Book of Sericulture Technologies*. Central Silk Board, Bangalore, India.
- GUPTA V. P. GOVINDAIAH & RAJU H. V. (1997) Diseases and associated pathogens of mulberry nurseries. *Indian Phytopathol.*, 50, 402-407.
- GUPTA V. P. & SARKAR A. (1999) Management of diseases in mulberry nurseries for better sapling survivability and growth. *Indian Farming*, 49, 15-16.
- HOITINK H. A. A. & KUTER G. A. (1984) Role of composts in suppression of soil borne plant pathogens of ornamental plants. *Biocycle*, 25, 40-42.
- KHAN M. A. & KHAN S. M. (2001) Biomangement of *Fusarium* wilt of tomato by the soil application of certain phosphate solubilizing microorganisms. *Int. J. Pest Management*, 47, 227-231.
- MANNA M. C. & GANGULY T. K. (1999) Composting an enrichment technology. *Indian Farming*, 49, 14-16.
- MILLER F. C. (1992) Composting as a process based on the ecologically selective factors. In: *Soil Microbial Ecology*, METTING F. B. Jr. (ed). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 515-544.
- SUBBARAO N. S., WANG H. K. & METTING F. B. JR. (1992) Composting and organic waste management in China and India. In: *Soil Microbial Ecology*, METTING F. B. Jr. (ed). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 561-576.
- SHARMA D. D., GOVINDAIAH, DAS P. K., PHILIP T., CHOUDHARY P. C. & DATTA R. K. (1994) Influence of bacterial biofertilizers under graded levels of nitrogen on the incidence of major mulberry diseases. *Indian J. Seric.*, 33, 31-35.
- SHARMA D. D., NAIK V. N., CHOWDARY N. B. & MALA V. R. (2003) Soilborne diseases of mulberry and their management – A review. *Int. J. Indust. Entomol.*, 7, 93-106.
- TRONSMO A. (1996) *Trichoderma harzianum* in biological control of fungal diseases. In: *Principles and practice of managing soilborne plant pathogens*, ROBERT H. (ed.). A. P. S. Press, American Phytopathological Society St. Paul, Mimesota, pp. 213-235.

EFFET DE COMPOSTS ENRICHIS AVEC DES MICROBES UTILES / ANTAGONISTES SUR LA SUPPRESSION DES MALADIES DE PEPINIERE CHEZ LE MURIER

D. D. SHARMA, MALA V. R., P. K. DAS & S. B. DANDIN

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

Nous avons réalisé des études pour évaluer l'effet de compost, préparé à partir de résidus séricicoles (SR: détritit de litière + déchets d'élevage) et de vermicomposts (VMC) enrichis avec du phosphate de roche (RP), des bactéries solubilisant le phosphate (PSB), des *Azotobacter* (Az), *Trichoderma harzianum* (Th) et *T. pseudokoningii* (Tp) sur la suppression des maladies de pépinière (chancre de la tige, pourriture des boutures, flétrissure des bourgeons, pourriture du collet et dépérissement), sur le bourgeonnement des boutures et sur la survie des jeunes plants. Parmi les différents composts enrichis, on observe le maximum de débouillage des boutures et de survie des plants chez les SR enrichis avec RP + Az + PSB + Th + Tp et les VMC enrichis avec Rp + Az + PSB + Th + Tp. L'augmentation des pourcentages de bourgeonnement et de survie avec les deux traitements est respectivement de 25,5 et 21,1 et de 26,6 et 21,7 par rapport au témoin (sol avec seulement la charge en pathogènes). Les valeurs enregistrées, sont significativement moins importantes que celles de la méthode recommandée (Mancozeb + Nursery guard (*T. pseudokoningii*)). Pour obtenir des valeurs égales ou significativement supérieures à celles de la méthode recommandée, on intègre des tourteaux de margousier aux traitements efficaces. Les résultats révèlent que SR et VMC enrichis avec RP + Az + PSB + Th + Tp, après le mélange avec du tourteau de margousier (2 : 1 à raison de 2 kg / m²), améliorent le bourgeonnement de respectivement 41,7 et 37,5 % et la survie de l'ordre de 45,4 et 40,9 %, par rapport au témoin et sont à égalité avec la méthode recommandée (débouillage 43,1 % et survie 46,4 %). L'échec du bourgeonnement avec tous les traitements est dû à l'attaque par des maladies comme la pourriture des boutures, le chancre de la tige et la flétrissure des bourgeons. Les jeunes plants meurent en raison de la pourriture du collet et du dépérissement. On peut donc utiliser le seri / vermi compost, enrichi avec des microbes utiles / antagonistes, après l'avoir mélangé avec des tourteaux de margousier (2 : 1) à raison de 2 kg / m² dans les plates-bandes des pépinières pour améliorer le bourgeonnement et la survie des jeunes plants, jusqu'à 45,4 % par rapport au témoin et le système n'est pas nuisible à l'environnement, tout en améliorant la santé du sol.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.), la seule plante hôte des vers à soie (*Bombyx mori* L.) est une culture pérenne multipliée par boutures. Pendant la multiplication dans la pépinière, les boutures sont exposées à l'infestation par plusieurs maladies véhiculées par le sol, telles que le chancre de la tige (*Botryodiplodia theobromae*), la pourriture des boutures (*Fusarium solani*), la flétrissure des bourgeons (*Fusarium lateritium* var. *mori*), la pourriture du collet (*Phoma sorghina*) et le dépérissement (*B. theobromae*), qui entraînent la mortalité des jeunes plants jusqu'à 35 % (Gupta et coll., 1997). Pour lutter contre ces maladies, on a mis au point une technologie intégrée qui consiste à tremper les boutures dans de la solution de Dithane M-45 (0,1 %) et à appliquer une bioformulation, c'est-à-dire le Nursery-Guard mis au point à partir de *Trichoderma pseudokoningii*, qui améliore la

survie jusqu'à 45 %, par rapport au témoin (Gupta et Sarkar, 1999 ; Sharma et coll., 2003). L'application continue d'engrais chimiques et l'utilisation de fongicides pour lutter contre les maladies détériore la santé du sol et pollue l'environnement. Au cours de la culture du mûrier et de l'élevage des vers à soie, une quantité énorme de résidus agricoles et d'élevage est générée, que l'on convertit en seri et vermi compost, en utilisant des technologies adaptées, pour le maintien de la santé du sol (Bhogesha et coll., 2005a). On utilise ces composts dans la culture du mûrier après l'enrichissement avec des microbes utiles (PSB et *Azotobacter*) et antagonistes (*T. harzianum* et *T. pseudokoningii*) pour diminuer l'utilisation d'engrais chimiques (Bhogesha et coll., 2005b). Plusieurs chercheurs ont rapporté que le compost enrichi avec PSB, *Azotobacter*, *T. harzianum*, *T. viride*, *Paecilomyces* sp., *Verticillium tenuipis*, etc. contribue beaucoup à gérer des maladies variées véhiculées par le sol chez certaines cultures horticoles et agricoles, tout en améliorant la fertilité du sol (Hoitink et Kuter, 1984 ; Subbarao et coll., 1992 ; Miller, 1992 ; Manna et Ganguly, 1999 ; Khan et Khan, 2001). Nous avons entrepris cette étude chez le mûrier pour évaluer l'effet du compost préparé avec des résidus séricicoles et des vermicomposts, enrichis avec du phosphate de roche, des microbes utiles / antagonistes, c'est-à-dire des bactéries solubilisant le phosphate, des *Azotobacter*, *Trichoderma harzianum* et *T. pseudokoningii* sur la suppression des maladies de pépinière, dans le but d'intégrer la technologie de gestion de la maladie à un système agronomique pour diminuer la main d'œuvre et le coût et aussi pour améliorer la santé du sol.

MATERIELS ET METHODES

1) Evaluation préliminaire de composts enrichis sur le bourgeonnement et la capacité de survie des boutures :

On procède à l'évaluation préliminaire pour connaître l'effet du compost préparé avec des résidus séricicoles [(SR) détritiques de ver à soie + déchets d'élevage], des vermicomposts (VMC), enrichis avec du phosphate de roche (RP), des microbes utiles [bactéries solubilisant le phosphate (PSB) et *Azotobacter* (Az)] et antagonistes [*T. harzianum* (Th) et *T. pseudokoningii* (Tp)] sur la suppression des maladies de pépinière. On ajoute du RP, à raison de 50 kg / t, aux déchets avant la décomposition. Au bout de 4 mois, on mélange le produit porteur de base d'*Azotobacter*, de PSB et des agents biologiques, à raison de 2 kg / t, avec des SR / VMC (Bhogesha et coll., 2005). Au bout d'un mois, on utilise les différents composts enrichis pour réaliser l'expérience. On procède à l'expérience selon une Conception Aléatoire en Blocs avec 10 traitements y compris le témoin (du sol avec seulement une charge de pathogènes) et la méthode recommandée (Mancozeb + Nursery Guard (*T. pseudokoningii*)). Chaque traitement concerne une surface de pépinière d'1 m², répété trois fois. On utilise l'inoculum de pathogènes mélangés, provoquant les maladies de litière à raison de 500 g / sous-parcelle (4,7 × 10⁷ spores / g). Au bout de 15 jours, on répand le compost enrichi dans les plates-bandes de la pépinière à raison de 2 kg / m² et on le mélange bien dans le sol. Pour l'étude, on sélectionne V-1, une variété de mûrier à rendement élevé, sensible aux maladies de pépinière. On plante 100 boutures de tige / sous parcelle, d'après le système pour pépinière, avec une irrigation régulière (Dandin et coll., 2003). On construit des digues entre les sous-parcelles pour minimiser l'interférence entre les parcelles. On recueille les données sur la germination des boutures (30^{ème} jour) et sur la survie des jeunes plants (90^{ème} jour). On examine les boutures et les jeunes plants morts, par rapport aux symptômes des maladies de pépinière du mûrier véhiculées par le sol, c'est-à-dire le chancre de la tige, la pourriture des boutures, la flétrissure des bourgeons, la pourriture du collet et le dépérissement. On calcule le pourcentage d'incidence de la maladie d'après la formule :

$$\text{Incidence de maladie (\%)} = \frac{\text{Nombre de boutures mortes}}{\text{Nombre total de boutures plantées}} \times 100$$

On sélectionne la méthode recommandée comme l'un des traitements, pour connaître l'efficacité des composts enrichis sur la suppression des maladies de pépinière en fonction de la germination et de la survie des boutures, afin de sélectionner les meilleurs traitements de composts enrichis, pour atteindre un objectif égal ou supérieur à la méthode recommandée.

ii) Test des traitements efficaces sur la germination et la survie des boutures :

Les traitements, qui se sont avérés efficaces lors de l'évaluation préliminaire, sont testés avec le tourteau de margousier (obtenu à partir de graines de margousier (*Azadirachta indica* L.) après l'extraction de l'huile), puisqu'il s'avère efficace pour lutter contre les maladies véhiculées par le sol chez le mûrier (Sharma et coll., 2003). L'expérience est réalisée dans du sol malade, avec une charge en spores de $2,9 \times 10^7$ / g de sol, selon une RBD avec 7 traitements, comprenant 4 traitements efficaces de composts enrichis, le tourteau de margousier, le témoin (sol ne contenant que la charge de pathogènes) et la méthode recommandée. Chaque traitement concerne une pépinière de 5m^2 avec 3 répétitions. Le compost enrichi est répandu, après l'avoir mélangé avec du tourteau de margousier (2 : 1) à raison de $2\text{ kg} / \text{m}^2$, dans les pépinières et on l'incorpore dans le sol. On plante 500 boutures de la variété V-1 dans chaque sous-parcelle, puis on procède à l'irrigation. On recueille les données sur la germination, la survie et les maladies des boutures et des jeunes plants.

RESULTATS

(i) Evaluation préliminaire de la germination et de la survie des boutures avec des composts enrichis :

Tous les traitements de composts, préparés avec des SR et des VMC enrichis avec des microbes utiles / antagonistes, augmentent la germination des boutures (1,1 à 25,4 %) et la survie des jeunes plants (1,7 à 26,6 %), par rapport au témoin (sol avec seulement une charge en pathogènes). Mais on observe la germination (25,4 %) et la survie (26,6 %) maximums avec T4 (SR enrichis avec RP + Az + PSB + Th + Tp), suivi par T-8 (VMC enrichis avec RP + Az + PSB + Th + Tp), ce qui augmente la germination et la capacité de survie de respectivement 21,1 et 21,7 %. Les autres meilleurs traitements sont T3 (SR enrichis avec RP + Th + Tp) et T7 (VMC enrichis avec RP + Th + Tp), qui augmentent la germination et la capacité de survie de 17,8 à 20 %. Il n'existe pas de différences significatives entre ces trois traitements (Tableau I). Cependant, les valeurs ci-dessus sont significativement moins importantes que celle de la méthode recommandée. Avec tous les traitements, l'échec de la germination est dû à l'attaque par des maladies de pépinières véhiculées par le sol, comme la pourriture des boutures, le chancre de la tige et la flétrissure des bourgeons. La mort des jeunes plants se produit à cause de la pourriture du collet et du dépérissement (Tableau II). Les trois traitements de composts enrichis (T-4, T-8 et T-7) sont sélectionnés pour l'évaluation finale.

ii) Evaluation des traitements efficaces pour le bourgeonnement et la capacité de survie des boutures :

Les SR et VMC, enrichis avec RP + Az + PSB + Th + Tp, après les avoir mélangés avec du tourteau de margousier augmentent la germination de 41,7 et de 37,5 % et la survie de l'ordre de respectivement 45,4 et 40,9 % par rapport au témoin (Tableau III). Ces valeurs sont les mêmes que celles de la méthode recommandée (germination - 43,1 % et survie - 46,4 %). Avec les différents traitements, la sévérité de la pourriture des boutures est très élevée, suivie par le chancre de la tige, la flétrissure des bourgeons, la pourriture du collet et le dépérissement (Tableaux II & IV).

DISCUSSION

Dans cette étude, on pourrait attribuer l'amélioration de la germination des boutures et de la capacité de survie des jeunes plants avec les SR et VMC enrichis avec du RP + Az + PSB + Th + Tp,

après le mélange avec du tourteau de margousier, à l'effet complémentaire des *Azotobacter*, des PSB, de *T. harzanium*, de *T. pseudokoningii* et du tourteau de margousier. Grâce à cela, les pathogènes, qui provoquent les maladies de pépinière comme *B. theobromae*, *F. solani*, *F. lateritium* var. *mori* et *Phoma sorghina*, sont supprimés, ce qui protège donc les boutures de l'attaque. Le tourteau de margousier diminue la charge de pathogènes dans le sol, par la production de substances toxiques, telles que le nimbidine, le thionémone et les phénols, qui sont toxiques pour les pathogènes véhiculés par le sol (Alam, 1993), tandis que les espèces de *Trichoderma* inhibent la croissance des pathogènes par l'hyper-parasitisme, la compétition et l'antibiose. Pendant l'antibiose, on sait aussi que *Trichoderma* produit des enzymes hydrolytiques et des composés antifongiques, comme les chitinases, la trichodermine et la gluconase, qui dissolvent la paroi cellulaire des champignons pathogènes, et arrêtent leur croissance, (Tronsmo, 1996). *Azotobacter* est capable de produire des hormones de croissance et des vitamines, c'est-à-dire de la gibbérelline, de la biotine, de l'acide nicotinique, qui contribuent à induire la résistance chez le mûrier contre certains pathogènes (Subbarao et coll., 1992 ; Sharma et coll., 1994). Les bactéries solubilisant le phosphate produisent des métabolites toxiques comme la bulbiformine, la phénazine, les acides organiques, les sidérophores, etc., qui contribuent à diminuer l'infestation par les pathogènes véhiculés par le sol (Dalla, 1986).

Gupta et Sarkar (1999) ont observé que le chancre de la tige, la pourriture des boutures, la flétrissure des bourgeons, la pourriture du collet et le dépérissement sont les principales maladies véhiculées par le sol, pendant l'établissement initial d'une plantation de mûrier. Ils ont rapporté que l'application du biofongicide, le Nursery-Guard (*T. pseudokoningii*) améliore la germination des boutures et la capacité de survie des boutures de l'ordre de 45 %, tout en améliorant la croissance des racines et des pousses des jeunes plants.

Les résultats de cette étude concordent avec les observations de Hoitink et Kuter (1984), qui ont rapporté que le compost préparé à partir d'écorces d'arbres enrichies avec *Trichoderma* spp., améliore les niveaux de population des agents de lutte biologique et contribue donc à supprimer les pathogènes véhiculés par le sol. Khan et Khan (2001) ont rapporté que l'application de PSB diminue la sévérité de la flétrissure de la tomate, provoquée par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* de 23 à 49 %.

Notre étude montre que pour diminuer l'incidence des maladies véhiculées par le sol dans la pépinière et pour améliorer l'obtention de jeunes plants, on peut utiliser du compost préparé avec des résidus séricicoles / des vermicomposts, enrichis avec du phosphate de roche + *Azotobacter* + bactéries solubilisant le phosphate + espèces de *Trichoderma*, après le mélange avec du tourteau de margousier (2 : 1), à raison de 2 kg / m², dans la pépinière. Ce système ne nuit pas à l'environnement, tout en améliorant la santé du sol et des jeunes plants.

EVALUATION OF SOME CHEMICALS AGAINST *PESTALOTIOPSIS DISSEMINATA* CAUSING GREY BLIGHT OF SOM

RANJANA DAS , K. DAS & D. K. JHA*

Central Muga Eri Research & Training Institute, Central Silk Board, Lahdoigarh -785700, Jorhat ,
Assam, India.

Fungicidal treatment on mycelial growth showed that Carbendazim (Bavistin), Thiophanate methyl (Topsin M) and Phenyl pyrrole (Celest) had completely inhibited the growth of the pathogen at all concentrations. Mancozeb (Indofil M-45) was found effective only at higher concentration. No sporidial germination was recorded in the plates amended with Carbendazim (Bavistin), Thiophanate methyl (Topsin M) and Phenyl pyrrole (Celest). Copper oxychloride showed a higher per cent of conidial germination (2.32). The disease severity on all the five fungicides was significantly lower than the check. Bavistin was found most inhibitory followed by Topsin-M.

Keywords: Control, fungicides, grey blight, som.

INTRODUCTION

“Som” (*Persea bombycina* Kost), the primary food plant of muga silkworm, grows abundantly in north eastern region (Choudhury, 1981). This food plant is prone to various diseases that affect the quality and quantity of leaves and ultimately affect cocoon yield production (Das *et al*, 2003). Grey blight is one of the major foliar disease of som plant caused by *Pestalotiopsis disseminata* (Thum) Stey (Bharali, 1969). It was observed 48-59% plant infection during March to September with 13.8-21.6% leaf area destruction (Das and Benchamin, 2000). The leaf loss in Grey blight disease was estimated at 1273 kg per hectare per annum (Das and Benchamin, 2000). Thus, there is a need to evolve suitable management strategy so that, the loss due to diseases may be prevented and the economic value of the crop is raised. Therefore considering the importance of the disease, attempt was made to estimate the influence of different fungicides on mycelial growth, conidial development and the disease development of *Pestalotiopsis disseminata* the causal organism of Grey blight disease of “som plant.”

MATERIALS AND METHODS

Screening of fungicides *in vitro*:

Five fungicides namely, Carbendazim 50% Wp (Bavistin) Copper oxychloride 50%Wp (Bitox 50), Mancozeb 75% (Indofil M-45), Thiophanate methyl (Topsin M) and Phenyl pyrrole (Celest) at 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 per cent concentrations were tested against *Pestalotiopsis disseminata* by the food poison technique (Nene and Thaplyal, 2000) Equal volume of potato dextrose agar medium in flasks was mixed with the required quantities of above mentioned fungicides. The medium was

* Dept. of Botany. Gauhati University. Guwahati. Assam. India.

then poured in sterilized petridishes. A mycelial disc of 5 mm diameter of the pathogen was taken from the 7 days old culture with the help of sterilized cork borer and placed at the center of the petridishes. A mycelial disc of the pathogen on PDA without adding any fungicide served as check (control). Each treatment was replicated thrice. Linear mycelial growth and germination of conidia were recorded after a 24 hours interval up to 5 days.

Screening of fungicides under field condition:

An experiment was conducted during from 2001 to 2004 under field condition. The experiment was laid out in a randomized block design (RBD) with three replications. The spacing of the plantation was 3 × 3m. After one month of pruning the experimental plants were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/ml) of *Pestalotiopsis disseminata* by high volume sprayer, one day before spraying of fungicides. Five above mentioned fungicides were used along with check. Three sprays of above fungicides at @ 0.20 percent were given during the period (first at May 15th rest at 15 days of interval). The disease severity was assessed on 5 randomly selected plants from each replication, 15 days after the last spray by categorizing the infected leaves in 0-5 grading scale.

Grading	Scale	% leaf area infected
0 =		No disease
1 =		1-20% leaf area destroyed by the disease
2 =		21-30% leaf area destroyed by the disease
3 =		31-40% leaf area destroyed by the disease
4 =		41-50% leaf area destroyed by the disease
5 =		Above 50% leaf area destroyed by the disease

The percent disease index (PDI) for each treatment was calculated by using the formula Anonymous (1984).

$$\text{Percentage Disease Index (PDI)} = \frac{\text{Sum of numerical values} \times 100}{\text{Total number of leaves observed} \times \text{Maximum grading i.e. 5}}$$

The numerical value was calculated by the number of leaves infected multiplied by respective grading

The percent disease index was converted into angular transformed value for the data analysis.

RESULT AND DISCUSSION

Data revealed that out of five fungicides (Table I) carbendazim (Bavistin), thiophanate methyl (Topsin-M) and phenyl pyrrole (Celest) had completely inhibited the growth of the pathogen at all concentrations tested. Mancozeb (Indofil M-45) was found effective at higher concentration. Copper oxychloride (Blitox-50) was found least effective, as it did not cause substantial reduction in growth of the pathogen as compared to check.

Similar trend of response to treatment was noted for germination of conidia (Table II). No germination was recorded in the PDA plates amended with carbendazim (Bavistin), thiophanate methyl (Topsin-M) and phenyl pyrrole (Celest). However in Mancozeb (Indofil M-45) treatment a few germination of conidia (0.83) was recorded. Copper oxychloride (Blitox-50) showed a higher per cent of conidial germination i.e. 2.32 as against 8.75 in check showing ineffectiveness in reducing the inoculum of the disease.

Field studies (Table III) on the efficacy of fungicidal sprays on grey blight severity revealed that percentage of disease severity varied between 20.00 and 50.33 being lowest with Bavistin and highest

with Indofil M 45. The percentage of disease severity in check was 84.22 which is varying significantly from all the five fungicides tested.

Table I. Effect of different fungicides on linear mycelial growth *Pestalotiopsis disseminata* (Thum) Stey.

Tableau I. Effet de différents fongicides sur la croissance mycéliale linéaire de *Pestalotiopsis disseminata* (Thum) Stey.

Treatment	Average linear of mycelium growth (mm) at different concentrations (%)				
Traitement	Croissance linéaire moyenne (mm) du mycelium avec différentes concentrations (%)				
	0.05	0.10	0.15	0.20	Av. Moyenne
Bavistin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bitox -50	91.3	87.6	90.0	64.3	83.3
Indofil M 45	64.0	34.4	30.3	0.0	32.2
Topsin-M	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Celest	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Control / Témoin	89.9	89.5	89.4	90.0	92.2
C.D. at 5% / CD à 5 %					
Within concentration		5.9			
A l'intérieur de la concentration					
Between treatment / Entre les traitements		3.8			
Control v/s rest / Témoin par rapport au reste		5.1			

The disease severity recorded with all the five fungicides was significantly lower than for the check. Thus, there was a significant decrease severity with above mentioned fungicides. However Bavistin was found most inhibitory followed by Topsin-M. No information is available on the effect of Bavistin and Topsin-M on disease severity of Gray blight disease under field conditions.

Harsh *et al.* (1987) reported the effectiveness of Bavistin at 0.1% concentration and Dithan M 45 at 0.3% concentration against *Pestalotiopsis. vericolor*, which caused the foliar disease in *Diospyros melanoxylon* Roxb. Various workers have reported that Bavistin (carbendazim), Tilt 250. EC, Cupravit and Dithan M 45 (Mancozeb) performed best against *Pestalotia palmarum* (Kundalkar, *et al.*, 1991; Khaleqizaman, *et al.*, (2001). Complete inhibition of *Pestalotiopsis mangiferae* colony growth at the lowest concentration (0.11%) of Carbendazim was reported by Pandey *et al.*, (2006). Similar results obtained in this study also. Bavistin (carbendazim) at 0.20 percent concentration can effectively minimize the severity of Gray blight disease of som plant. However it was observed that no residual toxicity of Bavistin (carbendazim) was recorded in muga silkworm (Das and Benchamin, 2000) Guneseckhar *et al.*, (1995) reported similar result in mulberry food plant caused by *Cerotelium fis*.

Table II. Effect of different fungicides on conidial germination in *Pestalotiopsis disseminata*.**Tableau II. Effet des différents fongicides sur la germination conidiale chez *Pestalotiopsis disseminata*.**

Treatment	Average conidial germination (%) in response to different concentrations (%) of fungicides (square root values)				
Traitement	Germination conidiale moyenne (%) en réponse à différentes concentrations (%) de fongicides (valeurs des racines carrées)				
	0.05	0.10	0.15	0.20	Av. Moyenne
Bavistin (carbendazim)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bitox-50 (copper oxychloride)	7.0	5.0	5.4	2.3	2.32
Bitox-50 (oxychlorure de cuivre)					
Indofil M 45 (mancozeb)	1.23	1.12	0.97	0.0	0.83
Topsin-M (thiophanate methyl)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Celest (phenyl pyrrole)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Control / Témoin	8.0	9.0	9.0	9.0	8.75
C.D. at 5% / DC à 5 %					
Within concentration / Pour la concentration		0.47			
Between treatment / Entre les traitements		0.19			
Control v/s rest / Témoin par rapport au reste		0.34			

Table III. Effect of fungicidal sprays on grey blight intensity under field condition.**Tableau III. Effet des vaporisations de fongicides sur l'intensité de la flétrissure grise sur le terrain.**

Treatment	Disease severity
Traitement	Sévérité de la maladie
Bavistin (carbendazim)	20.00 (26.47)
Bitox-50 (copper oxychloride)	45.93 (42.65)
Bitox-50 (oxychlorure de cuivre)	
Indofil M 45 (mancozeb)	50.33 (45.42)
Topsin-M (thiophanate methyl)	42.22 (42.18)
Celest (phenyl pyrrole)	45.90 (42.61)
Control / Témoin	84.22 (69.22)
CD at 0.05% / DC à 0,05 %	11.32

The study suggests that Carbendazim (Bavistin) at 0.20 percent concentration can be effectively used for minimizing the severity of Gray blight disease of som. It is enough to use two sprays at 15 days interval to suppress the prevailing disease.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1984) Guideline for the biological evaluation of fungicides. No 68. O.E.P.P./ E.P.P.O. Bulletin 14 : 227.
- BHARALI N. (1969) Grey blight disease of Som. Plant Science & Culture 35: 573-74.
- CHOUDHURY S.N. (1981) Muga Silk Industry. Directorate of Sericulture. Govt. of Assam.
- DAS R. & BENCHAMIN K.V. (2000) Diseases of muga and eri food plants: Incidence pattern, Intensity and control measures. Proceedings of National Seminar on Sericulture, R & D in Muga and Eri, CMER&TI, JORHAT .ASSAM. PP.34-45
- DAS R., DAS. K. & BENCHAMIN K. V. (2003) Diseases of Muga food plant Som. Indian Silk 41: 23-24.
- GUNSEKHAR V.,GOVINDAIH & HIMANTHARAJU M.T.(1995) Efficacy of fungicides in controlling in mulberry leaf rust caused by *Cerotelium fisi*. Ind. J. Seric. 34:60-62.
- HARSH NSK, NATH V., TIWARI C.K. REHILL, P.S (1987) Studies on new foliar disease of *Diospyros melanoxylon* Roxb. Van Vigyan 25:16-20
- KHALEQIZZAMAN K., HOSSAIN ML. & HOSSAIN M M. (2001) Effect of fungicides and potash in controlling grey leaf spot of coconut. Bangladesh Journal of Trading and Development. 11:151-156..
- KUNDALKAR S.K., JOSHI M.S. & PAWAR D.R.(1991) Control of leaf blight of coconut caused by *Pestalotia palmarum* CKE. Indian coconut journal 22:18-19.
- NENE Y.L. & THAPLYAL P.N. (2000) Fungicides in plant disease control. 3rd Ed. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. Pp 531-532.
- PANDEY A., SHUKLA A.N. & CHANDRA S.(2006) *Pestalotiopsis* stem canker of *Jatropha curcas*. Indian Forester. 132:763-766.

EVALUATION DE CERTAINS PRODUITS CHIMIQUES CONTRE *PESTALOTIOPSIS DISSEMINATA* RESPONSABLE DE LA FLETRISSION GRISSE CHEZ SOM

RANJANA DAS, K. DAS & D. K. JHA*

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

L'effet du traitement fongicide sur la croissance mycéliale montre que le carbendazim (Bavistine), le thiophanate de méthyle (Topsin M) et le phényle Pyrole (Celest) ont complètement inhibé la croissance du pathogène à toutes les concentrations. Le Mancozeb (Indofil M-45) ne s'avère efficace qu'à la concentration la plus élevée. On n'enregistre pas de germination sporidiale chez les plaques amendées avec du Carbendazim (Bavistin), du thiophanate de méthyle (Topsin M) et du phényle pyrole (Celest). L'oxychlorure de cuivre entraîne un pourcentage plus élevé de germination conidiale (2,32). La sévérité de la maladie avec les cinq fongicides est significativement plus faible que chez le témoin. La Bavistine s'avère le plus inhibiteur, suivi par le Topsin-M.

INTRODUCTION

« Som » (*Persea bombycina* Kost), la plante hôte principale du ver à soie muga, pousse abondamment dans la région du nord-est de l'Inde (Choudhury, 1981). Cette plante hôte est sujette à des maladies variées, qui ont un effet sur la qualité et sur la quantité de feuilles et en dernier lieu sur le rendement en cocons (Das et coll., 2003). La flétrissure grise est l'une des principales maladies foliaires de la plante Som, provoquée par *Pestalotiopsis disseminata* (Thum) Stey (Bharali, 1969). On observe 48 à 59 % d'infestation des plants, de mars à septembre, avec 13,8 à 21,6 % de destruction de la surface foliaire (Das et Benchamin, 2000).

On estime la perte de feuilles, avec la maladie de la flétrissure grise, à 1273 kg par hectare, par année (Das et Benchamin, 2000). Il est donc nécessaire de mettre au point une stratégie de gestion adaptée, de sorte que l'on puisse éviter les pertes dues aux maladies et qu'on puisse augmenter la valeur économique de la culture. Compte tenu de l'importance de la maladie, nous avons donc essayé d'estimer l'influence de différents fongicides sur la croissance mycéliale, le développement conidial et le développement de la maladie de *Pestalotiopsis disseminata*, l'organisme responsable de la maladie de la flétrissure grise, de « la plante som ».

MATERIELS ET METHODES

Evaluation des fongicides *in vitro* :

On teste cinq fongicides à savoir, le carbendazim 50 % Wp (Bavistine), l'oxychlorure de cuivre à 50 % Wp (Bitox 50), le Mancozeb à 75 % (Indofil M-45), le thiophanate méthyle (le Topsin M) et le phényle pyrole à des concentrations de 0,05 ; 0,10 ; 0,15 et 0,20 % contre *Pestalotiopsis disseminata*, par la technique d'empoisonnement de la nourriture. On mélange un volume égal de

* Dept. Of Botany, Gauhati University, Guwahati, Inde.

milieu agar de dextrose de pomme de terre, dans des bouteilles, avec les quantités nécessaires des fongicides mentionnés plus haut. On verse ensuite le milieu dans des boîtes de Petri stérilisées. On prend un disque mycéliel de 5 mm de diamètre du pathogène, sur une culture de sept jours à l'aide d'un emporte pièce stérilisé et on le place au centre des boîtes de Petri. Un disque mycéliel du pathogène sans aucun ajout de fongicide sert de témoin. On répète chaque traitement trois fois. On enregistre la croissance mycéliale linéaire et la germination des conidies par intervalles de 24 heures jusqu'à 5 jours.

Evaluation des fongicides sur le terrain :

On a réalisé une expérience de 2001 à 2004 sur le terrain. L'expérience est disposée en blocs aléatoires (RBD) avec trois répétitions. L'espacement de la plantation est de 3 × 3 m. Un mois après la taille, on inocule les plants expérimentaux avec une suspension de spores (1×10^6 spores / ml) de *Pestalotiopsis disseminata*, avec un vaporisateur de grande contenance, un jour avant la vaporisation des fongicides. On utilise les cinq fongicides mentionnés plus haut. On procède à trois vaporisations de ces fongicides à 0,20 % au cours de la période (la première le 15 mai, les autres à 15 jours d'intervalle). On évalue la sévérité de la maladie sur 5 plants, sélectionnés au hasard dans chaque répétition, 15 jours après la dernière vaporisation, en classant les feuilles infestées sur une échelle de notation allant de 0 à 5.

Notation Echelle % de surface foliaire infestée

0 =	pas de maladie
1 =	1 à 20 % de surface foliaire détruite par la maladie
2 =	21 à 30 % de surface foliaire détruite par la maladie
3 =	31 à 40 % de surface foliaire détruite par la maladie
4 =	41 à 50 % de surface foliaire détruite par la maladie
5 =	au-dessus de 50 % de surface foliaire détruite par la maladie

On calcule l'indice de pourcentage de la maladie (PDI), pour chaque traitement, en utilisant la formule d'un Anonyme (1984).

Indice de Pourcentage de Maladie (PDI) =

$$\frac{\text{Somme des valeurs numériques} \times 100}{\text{Nombre total de feuilles observées} \times \text{classement maximum c'est à dire 5}}$$

On calcule la valeur numérique d'après le nombre de feuilles infestées, multiplié par le classement respectif.

On convertit le pourcentage de maladie en valeur angulaire pour l'analyse des données.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données révèlent que sur cinq fongicides (Tableau I), le carbendazim (Bavistine), le thiophanate de méthyle (Topsin-M) et le phényle pyrole (Celest) ont complètement inhibé la croissance du pathogène, à toutes les concentrations testées. Le Mancozeb (Indofil M-45) s'avère efficace à une concentration plus élevée. L'oxychlorure de cuivre (Blitox-50) s'avère moins efficace, puisqu'il n'entraîne pas de diminution importante de la croissance du pathogène par rapport au témoin.

On observe une tendance similaire de réponse au traitement pour la germination des conidies (Tableau II). On n'enregistre pas de germination dans les boîtes de Petri, amendées avec du

carbendazim (Bavistin), du thiophanate de méthyle (Topsin-M) ou du phényle pyrole (Celest). Cependant avec le traitement au Mancozeb (Indofil M-45), on enregistre la germination de quelques conidies (0,83). L'oxychlorure de cuivre (Blitox-50) présente un pourcentage plus important de germination conidiale, c'est-à-dire 2,32 contre 8,75 chez le témoin, ce qui montre son inefficacité.

Les études sur le terrain (Tableau III), concernant l'efficacité des vaporisations de fongicides sur la sévérité de la flétrissure grise, révèlent que le pourcentage de sévérité de la maladie varie entre 20 et 50,33 % en étant le plus faible avec la Bavistine et le plus élevé avec l'Indofil M 45. Le pourcentage de sévérité de la maladie chez le témoin est de 84,22 %, ce qui est significativement plus élevé par rapport aux cinq fongicides testés.

Il y a donc une baisse significative de la sévérité avec les fongicides mentionnés ci-dessus. Cependant, la Bavistine s'avère le plus inhibiteur, suivi par le Topsin-M. On ne dispose pas d'information sur l'effet de la Bavistine et du Topsin-M sur la sévérité de la maladie de la flétrissure grise sur le terrain.

Harsh et coll., (1987) ont rapporté l'efficacité de la Bavistine à une concentration de 0,1 % et du Dithan M 45 à une concentration de 0,3 % contre *Pestalotiopsis vericolor*, responsable d'une maladie foliaire chez *Diospyros melanoxylon* Roxb. Plusieurs chercheurs ont rapporté que la Bavistine (carbendazim), le Tilt 250 EC, le Cupravit et le Dithan M 45 (Mancozeb) donnent les meilleurs résultats contre *Pestalotia palmarum* (Kundalkar et coll., 1991 ; Khaleqizzaman et coll., 2001). Pandey et coll., (2006) ont rapporté l'inhibition complète de la croissance des colonies de *Pestalotiopsis mangiferae*, à la concentration la plus faible (0,11 %) de Carbendazim. On a obtenu des résultats similaires dans cette étude. La Bavistine (Carbendazim), à une concentration de 0,20 %, peut minimiser la sévérité de la maladie de la flétrissure grise de la plante som de manière efficace. Par ailleurs, on a observé qu'il n'y a pas de toxicité résiduelle de la Bavistine (carbendazim) chez le ver à soie muga (Das et Benchamin, 2000). Gunasekhar et coll., (1995) ont rapporté des résultats similaires provoqués par *Cerotelium fis* chez le mûrier.

L'étude suggère qu'on peut utiliser le Carbendazim (Bavistin) à 0,20 % avec efficacité pour minimiser la sévérité de la maladie de la flétrissure grise de Som. Deux vaporisations suffisent, à 15 jours d'intervalle, pour supprimer la présence de la maladie.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY** 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 × 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.