

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef

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

Articles scientifiques / Scientific papers

- Ovary transplantation in the silkworm *Bombyx mori* L.: parthenocloning by eggs produced in male recipient** 123
 Transplantation d'ovaires chez le ver à soie *Bombyx mori* L. : parthénoclonage par des œufs produits chez le récepteur mâle 129
 V. Y. ZABELINA & V. V. KLYMENKO

- Polymorphic variants of superoxide dismutase and glucose 6-phosphate dehydrogenase in hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*** 133
 Variants polymorphiques de la superoxyde dismutase et de la glucose 6-phosphate deshydrogénase dans l'hémolymph du ver à soie, *Bombyx mori* 141
 HIROSHI FUJII, YUTAKA BANNO & KOHJI YAMAMOTO

- Effect of cholesterol supplementation through leaf diet on the nutrition and economic characters of the silkworm, *Bombyx mori* L.** 145
 Effet d'un supplément en cholestérol avec une alimentation à base de feuilles sur la nutrition et les caractères économiques du ver à soie, *Bombyx mori* L. 163
 FIRDOSE AHMAD MALIK & Y. SRINIVASA REDDY

- Antiviral action of phyto extract against cytoplasmic polyhedrosis virus and its effect on total and differential hemocyte count in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.** 173
 Action antivirale de phyto-extraits contre le virus de la polyédrose cytoplasmique et son effet sur le compte total et différentiel en hémocytes chez le ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* D. 183
 G. P. SINGH, S. B. ZEYA, VARUN KULRESHTHA, N. G. OJHA & N. SURYANARAYANA

Rapports techniques / Technical reports

- Influence of senescence on the growth and yield parameters of mulberry under temperate conditions** . . . 189
 Influence de la sénescence sur les paramètres de croissance et de rendement du mûrier dans des conditions tempérées 193
 M. R. MIR, R. KOUR, ANIL DHAR, HAROON RASHID & M. A. KHAN

- Prediction of leaf rust disease in mulberry for timely management** 195
 Prédiction de la maladie de la rouille de la feuille chez le mûrier pour une gestion précoce 203
 V. NISHITA NAIK, D. D. SHARMA, V. R. MALA, M. REKHA, GOVINDAIAH & V. P. GUPTA

- Response of certain agronomical practices in perennial cultivation of castor utilization for eri silkworm rearing** 207
 Réponse à certaines pratiques agronomiques dans la culture pérenne du ricin utilisé pour l'élevage du ver à soie eri 213
 M. C. SARMAH, U. HAZARIKA & R. CHAKRAVORTY

OVARY TRANSPLANTATION IN THE SILKWORM *BOMBYX MORI* L.: PARTHENOCLONING BY EGGS PRODUCED IN MALE RECIPIENT

V. Y. ZABELINA & V. V. KLYMENKO

V. N. Karazin Kharkiv National University, Germ and Stem Cell Laboratory, Svobody Sq. 4, Kharkiv, 61077, Ukraine.

The eggs produced in the ovaries that had been transplanted from clonal females into male hosts were studied in the silkworm. The oogenesis and the capability for parthenogenetic development of mature eggs excised from the male host moths have been estimated. The in-male-produced eggs retain, at a somewhat decreased level, their clonal ability for complete thermal parthenogenesis; they give rise to the next female clonal generation without diapause, the hatching larvae showing phenotypic diversity as to expression of clonal pigmentation traits during the first instar. The obtained experimental females could be then reproduced parthenogenetically with the same success as the donor clone.

Keywords: *Bombyx mori*, oogenesis, egg activation, thermal parthenogenesis, clone, gonad transplantation, diapause, clonal variation.

INTRODUCTION

The mechanism of egg capability for thermal parthenogenesis in the silkworm (Astaurov, 1940) remains insufficiently investigated. One of the approaches to the problem could be analysis of the oogenesis and eggs produced in the ovaries that had been cultured during some time in the male recipient after transplantation (Klymenko, 2001). Ever since it has been shown that vitellogenins are not necessary for parthenogenetic development (Yamashita, Irie, 1980) we are faced with the question: what are those proper female proteins that underlie the egg capability for thermal activation and its ability to complete the triggered development? Do they ever exist?

As the first step in this direction we have extended the model used in Yamashita's cited work: several stable parthenoclones reproduced in our laboratory have been chosen as ovary donors; this, together with the egg-sex-marked line, makes sexing sure from egg stage and gonad transplantations practicable in the early instars (not only in the V instar). In this way we could vary the duration of ovary cultivation in the male haemolymph, which is known to affect the oogenesis by different substances migrating through the gonad wall into developing oocytes. We guess that the degree of opposite sex influence on the oogenesis can be estimated through the ability for thermal parthenogenesis of the eggs developed in the implants and through the changes in the phenotype observed in the produced parthenogenetic progeny.

MATERIALS AND METHODS

Diploid parthenoclone P29 (Astaurov, 1973) was used in this work. This clone has high viability, a number of genetic markers and the highest capability for thermal parthenogenesis: water heat shock

46°C during 18 minutes results in 100% activated (pigmented) eggs, the hatching of larvae considered as complete parthenogenesis being 95%. Besides P29 several other parthenogenetic clones with numerous genetic markers (Tazima, 1978) from our laboratory collection have been chosen as ovary donors: diploid clone P178 unique by its capacity to spontaneous parthenogenesis, tetraploid clone P4n17 (selected by Astaurov laboratory), diploid clones with high capability for thermal parthenogenesis Pos, P50 and Pwrl. The future male recipient was prepared by sexing the egg-sex-marked stock Soviet-5 (S-5) (Strunnikov, Gulamova, 1969) at egg stage. This stock has very low capability for thermal parthenogenesis (0.1-0.3%). The clones used and the stock are all monovoltine, i.e. the eggs produced by moths in bisexual or parthenogenetic reproduction enter diapause at early embryonic stage.

The operated larvae were reared in the same conditions as the control according to the adopted zootechnical norms (Tazima, 1978).

Ovary transplantation:

The effective technique used in this work for the silkworm ovary transplantation was developed and carefully described about 20 years ago (Spiridonova et al., 1987). The transplantations were done in the III and IV instars, one ovary being placed between the host's testes. In the course of the experiment we dissected the operated larvae from time to time to cytologically evaluate developing implants.

Thermoactivation:

The eggs produced by the implanted ovaries were excised from the male recipients and treated at 46° C during 18 min in the water ultra-thermostat according to the thermoactivation technique (Astaurov, 1940). The capability for thermal parthenogenesis of the eggs from one implant was measured by egg pigmentation (activation) percentage after the heat shock and by hatching (complete parthenogenesis) percentage of pigmented or all eggs of the implant.

RESULTS AND DISCUSSION

The recipient and implant survival rates (Table I) in the experiment are quite acceptable: 63% of the operated recipients have reached imago stage under the conditions used; 56% of the implanted ovaries have formed mature eggs in the male recipients.

The parthenoclonal lines used in this work are maintained many years in the laboratory collection and retain their genetic characters unchanged, the high capability for thermoparthenogenesis being only one of them. Having been formed in the ovaries exposed during long period to the opposite sex medium, the eggs of a clonal implant still show their inherent increased capacity to thermal parthenogenesis (Tables II and III). It is worthy to note that observed decrease in their capability for thermoactivation is much lower in most cases than about 30% loss of their potential for complete parthenogenesis. We can assume that some decrease in egg activation percentage is a consequence of the surgical stress, which sometimes may be very heavy. In other words, the heavier is the procedure of grafting for the recipient-implant the less is the number of eggs formed in the implant that are capable to start development. As to the additional big drop in egg ability to complete the development successfully triggered by the heat shock we incline to see the explanation in the deficit of some egg components that arise inside oocytes in the proper way during normal oogenesis. When several inbred lines had been derived from clone P29 their decreased level of parthenogenesis correlated with their lower heterozygosity (Altukhov, Klymenko, 1978) and with dropping out some proteins from their electrophoretic spectra as compared with the maternal clone P29 (Klymenko et al., 2006). Even if ovary grafts are performed in the II instar, the capability for complete parthenogenesis (clone P29) is still sufficient for cloning by Astaurov technique (Klymenko, et al., 2007).

Table I. Survival rates of the operated larvae and the implanted ovaries.**Tableau I. Taux de survie des larves opérées et des ovaires implantés.**

	Transplantation	Recipients <i>Récepteurs</i>	Recipients in the V instar <i>Récepteurs au 5ème âge</i>	Imago	Imago with implant <i>Imago avec implant</i>
1	P29→ Male S-5	30	25 (83%)	23 (77%)	21 (70%)
2	P178→ Male S-5	28	21 (75%)	18 (64%)	15 (54%)
3	P4n17→ Male S-5	27	20 (74%)	17 (63%)	16 (59%)
4	P50→ S-5	26	22 (85%)	17 (65%)	14 (54%)
5	Pwr1→ S-5	24	19 (79%)	13 (54%)	12 (50%)
6	Pos→ Male S-5	26	22 (85%)	15 (58%)	13 (50%)
7	Female S-5 → Male S-5	36	29 (80%)	23 (63%)	20 (55%)

Table II. Capability for thermal parthenogenesis of the eggs that developed in the ovaries transplanted from clonal and stock S-5 female larvae into male recipient larvae of the stock S-5.**Tableau II. Capacité à la parthénogenèse thermique des oeufs qui se sont développés dans les ovaires, transplantés des larves femelles clonales de la souche S-5 aux larves mâles réceptrices de la souche S-5.**

Transplantation	Imago	Total number of eggs	Egg activation		Larvae hatching		
					pcs.	% from activation	% from total number of eggs
			<i>Activation de l'oeuf</i>		<i>Eclosion des larves</i>		
		<i>Nombre total d'oeufs</i>	pcs.	%	pcs.	% à partir de l'activation	% à partir du nombre total d'oeufs
P29→S-5	21	2417	2248	93	1236	55	51
P178→S-5	15	1378	1172	85	586	50	43
P50→ S-5	14	861	680	79	354	52	41
Pwr1→ S-5	12	953	743	78	349	47	37
P4n17→ S-5	16	874	568	65	199	35	23
Pos→ S-5	13	793	317	40	95	30	12
Female S-5 → Male S-5	20	2104	400	19	0	0	0

So far as the recipient in all transplantations is the same stock S-5, which cannot be cloned because of its zero capability for complete parthenogenesis (Tables II and III), we conclude that the residual potential for parthenogenesis found in the implant eggs is based on the genetically determined ovarian activity of the donor clone. The residual potential of the implant egg in the clonal mother females becomes built up to the registered (control) level through the influx of the definite female substances that were absent in the male medium. The vitellogenins are probably not necessary for full thermal parthenogenesis (Yamashita, Irie, 1980) but they could, for example, raise its level.

Table III. Capability for parthenogenesis in the donor parthenoclones and in the recipient stock S-5 (intact control, normal oogenesis).

Tableau III. Capacité à la parthénogénèse chez les parthénoclones donneurs et chez la souche réceptrice S-5 (témoin intact, ovogénèse normale).

Material	Imago	Total number of eggs	Egg activation		Larvae hatching		
			pcs	%	% from activation		% from total number of eggs
			Activation des oeufs		Eclosion des larves		
Matériel		Nombre total d'oeufs	pcs.	%	pcs.	% à partir de l'activation	% à partir du nombre total d'oeufs
P29	21	6192	6068	98	5522	91	89
P178	15	5020	4668	93	3734	80	74
P 50	14	5112	4601	90	3834	83	75
Pwr1	12	3739	3103	83	2420	78	65
P4n17	16	5124	4765	93	3097	65	60
Pos	13	3817	3244	85	1816	56	48
S-5	20	5305	1856	35	9	0,5	0,2

As mentioned above, all of the live material, the donors and the recipient, in this experimentation is monovoltine. That is why we were surprised to find out that the eggs produced by ovaries grafted into male larvae are non-diapausing. After thermoactivation they develop without long break for aestivation and hibernation and give rise to the next (all-female!) progeny in about two weeks. The dropout of ontogenetic break means the normal mechanism of diapause based on diapause hormone is out of order if ovarian oogenesis proceeds in male host. In normal development the release of diapause hormone by female suboesophageal ganglion determines whether diapausing or non-diapausing eggs are laid, the endocrine milieu of the mother being of great importance in the interval between induction and expression of diapause. (Lees, 1955; Hasagawa, 1957).

We can suppose that diapause hormone in males is not produced by subesophageal ganglion or, if produced, it cannot make the egg enter diapause. Thus, females are responsible for the voltinism in the silkworm and this simple fact can be used for further analysis of hormone action mechanisms in the silkworm.

Larvae that hatched without diapause developed in the same way as the donor clone, from which the ovary was taken, and produced eggs that entered diapause after thermoactivation. It follows that observed male host effects do not extend over one generation.

Another unexpected "one generation phenomenon" was observed after grafting ovaries from clone P29 into S-5 male hosts. In six batches from different implants we observed non-diapausing simultaneous hatching of prevailing typical black and rare reddish-brown larvae (all were females). If reproduced this fact could mean expression of recessive gene *ch* in heterozygote *+ch* (P29) in some part of the eggs that had developed in the conditions of our experiment, the recipient being dominant homozygote *(+/+)*.

The stock S-5 has low capability for thermal parthenogenesis, the egg activation level being 35% and the hatching being 0.5% (Table III). The results of grafting S-5 ovaries into male larvae of the same stock are presented in Table II. In fact, stock S-5 is zero control in our experimentation, because the hatched larvae even in the intact case (Table III) usually die during the first instar. The ovary grafting procedure decreases the activation level from 35 to 19%. Such lowering is typical for ovary implantation experiments and seems connected not only with the evident trauma but also with some inevitable discordance in physiological states of the donor and the recipient, some criteria to estimate and eliminate this discrepancy being absent so far.

CONCLUSION

The eggs formed in the ovaries that have been transplanted from a parthenoclone into males of the stock with zero ability for cloning can be used for reproduction of the donor clone, though at somewhat lower level of the thermal parthenogenesis. Development of the ovary in male host affects, supposedly through modified oogenesis, some phenotypic traits of the donor clone; among those the dropout of diapause and penetrance of a recessive allele are of significant interest for further studies on the mechanisms of diapause and gene expression in the silkworm. The loss of diapause in monovoltine parthenoclones can also simplify their genetic transformation into different transgenic clones with known techniques, which deal so far with bisexual strains (Tamura *et al.*, 2000).

The observed changes of the clonal phenotype disappear in the next parthenogenetic progeny produced by normal thermoactivation what evidences their character of temporary modifications. The eggs of the next clonal generation enter diapause, the hatched larvae of clone P29 being all black as usual.

The results obtained show that placing the ovary in male body milieu results in serious changes in the oogenesis which affect expression, probably, of many genes including those underlying the egg ability to parthenogenesis induced by Astaurov method. Through analysis of the changes and their effects on parthenogenetic development we hope to approach the molecular mechanism of thermal parthenogenesis.

REFERENCES

- ALTUKHOV Y. P., KLYMENKO V. V. (1978) Positive correlation between the level of individual heterozygosity and the ability for complete thermal parthenogenesis in the silkworm. Dokl. Akad. Nauk USSR, 239(2), 460-462 (*in Russian, ER*).
- ASTAUROV B.L. (1940) Artificial parthenogenesis in the Silkworm, *Bombyx mori* L., 240p, AN SSSR, Moscow-Leningrad (*in Russian, ER*).

- ASTAUROV B.L. (1973) Selection by capability to artificial thermal parthenogenesis and obtaining improved in this feature parthenoclones in the silkworm. *Genetika (USSR)*, 9(9), 93-106 (*in Russian, ER*).
- HASAGAWA K. (1957) Diapause hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Nature* 179, 1300-1301.
- KLYMENKO V. V. (2001) Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and prospects. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 70, 156-164.
- KLYMENKO V. V., DOROSHENKO K. A., ZABELINA V. Y. (2007) Thermal parthenogenesis in the silkworm: possibilities of cloning and non-diapausing hatching by ovary transplantation method. Progress and problems of genetics, selection and biotechnology (Ukraine), 1, 236-240 (*in Russian, ER*).
- KLYMENKO V. V., SPIRIDONOVA T. L., FROLOVA N. M. (2006) Ooplasmic determinants of silkworm egg capability for complete thermal parthenogenesis. *Biologicheskii vestnik (Ukraine)*, 10, 103-108.
- LEES A.D. (1955) The physiology of diapause in arthropods. Cambridge. Univ. Press, London.
- SPIRIDONOVA T.L., SHCHEGELSKAYA E.A., KLYMENKO V.V. (1987) Gonad transplantation in the larvae of Lepidoptera. *Izv. Akad. Nauk Moldavskoy SSR*, 2, 69-71 (*in Russian*).
- STRUNNIKOV V.A., GULAMOVA L.M. (1969) Artificial sex regulation in the silkworm. Breeding of the silkworm sex-marked stocks. Comm. I. *Genetika (USSR)*, 5(6), 52-71 (*in Russian, ER*).
- TAMURA T., THILBERT C., ROYER C., KANDA T., ABRAHAM E., KAMBA M., KOMOTO N., THOMAS J.L., MAUCHAMP B., CHAVANCY G., SHIRK P., FRASER M., PRUDHOMME J.C., and COUBLE P. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18, 81-84.
- TAZIMA Y. (1978) The Silkworm: An Important Laboratory Tool. 307 pp., Kodansha, Tokyo.
- YAMASHITA O., IRIE K. (1980) Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male hosts of the silkworm. *Nature*, 203, 385-386.
- ZABELINA V. Y., KLYMENKO V. V. (2006) Capability for thermal parthenogenesis in silkworm *Bombyx mori* L., developed in the ovaries, implanted in larval instar into the soma of the opposite sex. *Vestnik KhNU. Seriya Biologiya (Ukraine)*, 729, 76-80 (*in Russian, ER*).

TRANSPLANTATION D'OVAIRES CHEZ LE VER A SOIE BOMBYX MORI L. : PARTHENOCLONAGE PAR DES ŒUFS PRODUITS CHEZ LE RECEPTEUR MALE

V. Y. ZABELINA & V. V. KLYMENKO

V. N. Karazin Kharkiv National University, Germ and Stem Cell Laboratory, Svobody Sq. 4,
Kharkiv, 61077, Ukraine.

Nous avons étudié la production d'oeufs dans les ovaires qui ont été transplantés des femelles clonales dans des hôtes mâles chez le ver à soie. Nous avons observé l'ovogenèse et l'aptitude au développement parthénogénétique des œufs mûrs dans les papillons mâles hôtes. Les œufs produits à l'intérieur du mâle retiennent, à un niveau quelque peu diminué, leur aptitude clonale à la parthénogenèse thermique complète ; ils donnent naissance à la prochaine génération clonale femelle sans diapause, les larves qui éclosent présentent une diversité phénotypique pendant le premier âge en ce qui concerne l'expression des caractères de pigmentation clonale. On peut ensuite reproduire les femelles expérimentales obtenues de manière parthénogénétique avec le même succès que le clone donneur.

INTRODUCTION

Il n'y a pas eu assez de recherches entreprises chez le ver à soie sur le mécanisme d'aptitude des œufs à la parthénogenèse thermique (Astaurov, 1940). Une des approches du problème pourrait consister à analyser l'ovogenèse et la production d'œufs dans les ovaires, cultivés pendant un certain temps chez le récepteur mâle après la transplantation (Klymenko, 2001). Depuis qu'il a été montré que les vitellogénines ne sont pas nécessaires au développement parthénogénétique (Yamashita, Irie, 1980), nous devons faire face à la question suivante : quelles sont les véritables protéines femelles qui sous-tendent l'aptitude de l'œuf à l'activation thermique et son aptitude à terminer le développement induit ? Est-ce qu'elles existent vraiment ?

Pour effectuer le premier pas dans cette direction, nous nous sommes servis du modèle utilisé et cité dans la recherche de Yamashita : nous avons choisi plusieurs parthénoclones stables reproduits dans notre laboratoire comme donneurs d'ovaires, cela avec des œufs de la lignée limitée au sexe, rendant le sexage sûr à partir du stade de l'œuf et les transplantations des gonades praticables pendant les premiers âges (et non pas seulement pendant le 5^{ème} âge). De cette manière, nous avons pu faire varier la durée de la culture de l'ovaire dans l'hémolymphe, qui est connue pour affecter l'ovogenèse par différentes substances, qui migrent au travers de la paroi de la gonade dans les ovocytes qui se développent. Nous en avons déduit que l'on peut estimer le degré d'influence du sexe opposé par l'aptitude à la parthénogenèse thermique des œufs qui se sont développés dans les implants et par les changements de phénotype observés dans la descendance produite par parthénogenèse.

MATERIELS ET METHODES

Dans ce travail, nous avons utilisé le parthénoclone diploïde P29 (Astaurov, 1973). Ce clone a une viabilité élevée, un certain nombre de marqueurs génétiques et une aptitude des plus grandes à

la parthénogenèse thermique, un choc thermique à l'eau à 46° C pendant 18 minutes entraîne 100 % d'activation des œufs (pigmentés), l'éclosion des larves considérées comme complètement parthénogénétiques étant de 95 %. En plus de P29, nous avons choisi plusieurs autres clones parthénogénétiques avec de nombreux marqueurs génétiques (Tazima, 1978) provenant de la collection de notre laboratoire comme donneurs d'ovaire ; le clone diploïde P178 unique par son aptitude à la parthénogenèse spontanée, le clone tétraploïde p4n17 (sélectionné par le laboratoire d'Astaurov), les clones diploïdes avec une aptitude élevée à la parthénogenèse thermique Pos, P50 et Pwr1. On prépare le futur récepteur mâle en sexant la souche limitée au sexe Soviet-5 (S-5) (Strunnikov, Gulamova, 1969) au stade de l'œuf. Cette souche a une très faible aptitude à la parthénogenèse thermique (0,1 à 0,3 %). Les clones utilisés et la souche sont tous des monovoltins, c'est-à-dire que les œufs produits par les papillons dans la reproduction bisexuelle ou parthénogénétique entrent en diapause au début du stade embryonnaire.

Les larves opérées sont élevées dans les mêmes conditions que le témoin selon les normes zootechniques (Tazima, 1978).

Transplantation de l'ovaire :

La technique efficace utilisée dans ce travail pour la transplantation de l'ovaire du ver à soie a été mise au point et soigneusement décrite il y a environ 20 ans (Spiridonova et coll., 1987). On procède aux transplantations pendant les 3^{ème} et 4^{ème} âges, un des ovaires étant placé entre les testicules de l'hôte. Au cours de l'expérience, nous disséquons les larves opérées de temps en temps pour évaluer, sur le plan cytologique, les implants qui se développent.

Thermoactivation :

On excise les œufs produits par les ovaires implantés, chez les récepteurs mâles et on les traite à 46° C pendant 18 min. dans l'eau avec un ultra-thermostat selon la technique de thermo-activation (Astaurov, 1940). On mesure l'aptitude à la parthénogenèse thermique des œufs d'un implant par le pourcentage de pigmentation de l'œuf (activation) après le choc thermique et d'après le pourcentage d'éclosion (parthénogenèse complète) des œufs pigmentés ou de tous les œufs de l'implant.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les taux de survie du récepteur et de l'implant (Tableau I) dans l'expérience sont assez acceptables : 63 % des récepteurs opérés atteignent le stade d'imago dans les conditions utilisées ; 56 % des ovaires implantés forment des œufs dans les récepteurs mâles.

Les parthénoclones utilisés dans cette étude ont été maintenus pendant de nombreuses années dans la collection du laboratoire et leurs caractères génétiques restent inchangés, l'aptitude élevée à la thermoparthénogenèse étant seulement l'un d'eux. Ayant été formés dans les ovaires exposés pendant une longue période à l'environnement du sexe opposé, les œufs d'un implant clonal présentent encore leur aptitude inhérente élevée à la parthénogenèse thermique (Tableaux II et III). Il vaut la peine de noter que la baisse de leur aptitude à la thermoactivation que l'on observe est, dans la plupart des cas, bien en dessous d'une perte d'environ 30 % de leur potentiel à la parthénogenèse complète. Nous pouvons supposer qu'une certaine baisse du pourcentage d'activation des œufs est la conséquence du stress chirurgical, qui peut parfois être très lourd. En d'autres mots, plus la procédure de greffe est lourde pour le récepteur de l'implant, moins il y a d'œufs qui se forment dans l'implant, capables de commencer leur développement. En ce qui concerne la diminution importante de l'aptitude des œufs à terminer le développement induit par le choc thermique avec succès, nous sommes enclins à trouver l'explication dans le manque de certains composants des œufs, qui sont normalement présents à l'intérieur des ovocytes pendant l'ovogenèse normale. Quand on a réalisé plusieurs lignées consanguines du clone P29, on a constaté que la baisse du niveau de parthénogenèse est corrélée avec leur plus faible hétérozygosity (Altukhov, Klymenko, 1978) et avec la disparition

de certaines protéines de leurs spectres électrophorétiques par comparaison au clone maternel p29 (Klymenko et coll., 2006). Même si les greffes d'ovaires sont réalisées pendant le 2^{ème} âge, l'aptitude à la parthénogenèse complète (clone P29) est encore suffisante pour procéder au clonage d'après la technique d'Astaurov (Klymenko et coll., 2007).

Jusqu'à présent, dans toutes les transplantations, le récepteur est toujours la souche S-5, qui ne peut pas être clonée à cause de l'absence d'aptitude à la parthénogenèse complète (Tableaux II et III), nous en concluons que le potentiel résiduel à la parthénogenèse que l'on trouve dans les œufs implantés est basé sur l'activité ovarienne, déterminée génétiquement, du clone donneur. Le potentiel résiduel de l'œuf implanté dans les femelles clonales mères monte au niveau enregistré (témoin), par l'influx des substances femelles définies qui sont absentes du milieu mâle. Les vitellogénines ne sont probablement pas nécessaires à la parthénogenèse thermique complète (Yamashita, Irie, 1980), mais elles peuvent par exemple augmenter son niveau.

Dans cette expérience, comme nous l'avons mentionné plus haut, tous les matériaux vivants, les donneurs et le récepteur sont monovoltins. C'est pour cela que nous sommes surpris de constater que les œufs produits par les ovaires greffés chez les larves mâles n'entrent pas en diapause. Après la thermo-activation, ils se développent sans longue rupture pour l'estivation et l'hibernation et donnent naissance à la descendance (complètement femelle) en environ deux semaines. La disparition de la rupture ontogénique signifie que le mécanisme de diapause normal, basé sur l'hormone de diapause, ne fonctionne pas si l'ovogenèse ovarienne se produit chez l'hôte mâle. Dans le développement normal, la libération de l'hormone de diapause par le ganglion sous-oesophagien femelle détermine si des œufs avec diapause ou sans diapause sont pondus, le milieu endocrinien de la mère étant d'une grande importance pendant l'intervalle entre l'induction et l'expression de la diapause (Lees ; 1955 ; Hasagawa, 1957).

Nous pouvons supposer que le ganglion sous-oesophagien ne produit pas l'hormone de la diapause chez les mâles, ou si elle est produite, elle ne peut pas faire rentrer l'œuf en diapause. Les femelles sont donc responsables du voltinisme chez le ver à soie et on peut utiliser cette simple constatation pour l'analyse ultérieure des mécanismes d'action de l'hormone chez le ver à soie.

Les larves qui éclosent sans diapause se développent de la même façon que le clone donneur, dont on a pris l'ovaire et produisent des œufs qui rentrent en diapause après la thermo-activation. Il s'ensuit que les effets observés chez l'hôte mâle ne dépassent pas une génération.

On a observé un autre « phénomène uni générationnel » inattendu après avoir greffé les ovaires du clone P29 chez les hôtes mâles S-5. Chez six lots provenant de différents implants, nous avons observé une éclosion simultanée, sans diapause, de larves dominantes typiques noires et de quelques larves brique (toutes sont femelles). Si ce fait se reproduit, cela pourrait signifier l'expression d'un gène récessif *ch* dans l'hétérozygote + / *ch* (P29), dans une certaine partie des œufs qui se sont développés dans les conditions de notre expérience, le récepteur étant un homozygote dominant (+/+).

La souche S5 a une faible aptitude à la parthénogenèse thermique, le niveau d'activation de l'œuf étant de 35 % et l'éclosion de 0,5 % (Tableau III). Les résultats sur les greffes d'ovaires S-5 chez les larves mâles de la même souche sont présentés dans le Tableau II. En fait, la souche S-5 est le témoin zéro dans notre expérience, parce que les larves qui éclosent même dans le cas où elles sont intactes (Tableau III) meurent en général pendant le premier âge. La procédure de greffe de l'ovaire diminue le niveau d'activation de 35 à 19 %. Une telle baisse est typique des expériences d'implantation d'ovaire et semble liée non seulement au traumatisme évident mais aussi à une incompatibilité entre les états physiologique du donneur et du récepteur, les critères pour estimer cette incompatibilité étant absents jusqu'à présent.

CONCLUSION

Les œufs qui se forment dans les ovaires, qui ont été transplantés d'un parthénoclon à des mâles de la souche avec une aptitude zéro à se cloner, peuvent être utilisés pour la reproduction du clone

donneur, bien qu'à un niveau plus faible de parthénogenèse thermique. Le développement de l'ovaire dans l'hôte mâle affecte, apparemment par la modification de l'ovogenèse, certains caractères phénotypiques du clone donneur, parmi lesquels la disparition de la diapause et la pénétration d'un allèle récessif présentent un intérêt significatif pour des études ultérieures sur les mécanismes de la diapause et sur l'expression des gènes chez le ver à soie. La disparition de la diapause chez les parthénoclones monovoltins peut aussi simplifier leur transformation génétique avec des techniques connues qui concernent jusqu'à présent des souches bisexuelles en différents clones génétiques (Tamura et coll., 2000).

Les changements observés chez le phénotype clonal disparaissent dans la descendance parthénogénétique suivante, produite par thermoactivation normale, ce qui prouve leur caractère de modifications temporaires. Les œufs de la génération clonale suivante entrent en diapause, les larves du clone P29 qui éclosent étant toutes noires comme à l'accoutumée.

Les résultats obtenus montrent que le placement de l'ovaire dans l'environnement du corps mâle entraîne des changements importants dans l'ovogenèse, qui affectent probablement l'expression de nombreux gènes, y compris de ceux qui sous-tendent l'aptitude de l'œuf à la parthénogenèse, induite par la méthode d'Astaurov. Nous espérons approcher le mécanisme moléculaire de la parthénogenèse thermique par l'analyse des changements et de leurs effets sur le développement parthénogénétique.

POLYMORPHIC VARIANTS OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN HEMOLYMPH OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*

HIROSHI FUJII, YUTAKA BANNO & KOHJI YAMAMOTO*

Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

*On the course of database construction of various isozymes in the silkworm, *Bombyx mori*, we examined existence of superoxide dismutase (SOD) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) isozymes. In the present study, we developed the activity staining for G6PD. By using this method for G6PD as well as the activity staining for SOD, we discovered that SOD isozymes were revealed in the larval hemolymph of silkworm strains tested, whereas there is a single G6PD in various silkworm strains. To our knowledge, this is the first report to show zymograms of SOD and G6PG and identify new member of SOD and G6PD in the silkworm.*

Keywords: *Bombyx mori*, glucose 6-phosphate dehydrogenase, isozyme, superoxide dismutase, zymogram.

INTRODUCTION

The domesticated silkworm, *Bombyx mori*, has been an important insect for sericulture. Since homogeneous silkworms have been genetically developed, they have been used as a model animal for lepidopteran insects. Approximately five hundred of silkworm mutants have been identified and maintained (Banno *et al.* 2005), according to phenotypic characters such as egg-shape, skin color at larval stage and cocoon-shape (<http://kaiko.kyushu-u.ac.jp/index.html>; <http://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/index.jsp>). Genetic linkage analysis of silkworm has been prepared with these characters by RAPD (Yasukochi, 1998), AFLP (Tan *et al.* 2001) and RFLP (Nguu *et al.* 2005). Since draft-sequence of silkworm genome was provided, it has been proceeded to post-genome analysis in silkworm. We have evolved proteomic researches (Wang *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007) and database summarizing these results is available (<http://shigen.lab.nig.ac.jp/ISPD/index.jsp>).

Multiple isozymes have been identified in the silkworm, *B. mori* so far. For instance, chymotrypsin inhibitors (Fujii *et al.* 1996), 35K protease (Jiang *et al.* 2000), lipoproteins (Gamo, 1978), esterase (Eguchi *et al.* 1985) and acetyl glucosamininase (Kimura, 1981) have been investigated. For better understanding genetics, physiology and biochemistry of the silkworm, it is useful to integrate information on latent characters including isozyme pattern to visible characters with silkworm mutants. Thus, we have attempted to construct isozyme database in the silkworm. In the current study, we focus on superoxide dismutase (SOD) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD).

* Corresponding author. Kohji Yamamoto, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan. Fax: +81-92-624-1011, E-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

SODs are one of the enzymatic defenses against reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O_2^-) and H_2O_2 , which are primarily generated by aerobic metabolism. SOD is a ubiquitous metalloenzyme in aerobic organisms that plays a crucial role in protecting organisms against toxic effects caused by ROS (McCord and Fridovich, 1969; Bannister *et al.* 1987). G6PD is an enzyme involved in catalysis for the first step of the pentose phosphate pathway. G6PD converts glucose-6-phosphate into 6-phosphoglucono- δ -lactone and is responsible for preparation of reducing energy for cells. In human, deficiency of G6PD is common worldwide, and causes acute hemolysis in the presence of simple infection, ingestion of fava beans, medicines, antipyretics, and antimalarials. We report here on the polymorphism of SOD and G6PD in the hemolymph of the silkworm, *B. mori*.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm strains and preparation of hemolymph:

Larvae of silkworm strains were maintained at the Institute of Genetic Resources of Kyushu University and reared on mulberry leaves. Hemolymph specimens were collected in tubes containing a small amount of phenylthiourea and then stored at $-80^\circ C$ until used.

Polyacrylamide gel electrophoresis:

Native polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis (Native-PAGE), followed by activity staining for SOD was constructed according to Yamamoto *et al.* (2005a). Briefly, after electrophoresis on native polyacrylamide gels, the band corresponding to the SOD activity was visualized by incubation of the gels in nitroblue tetrazolium and riboflavin, and finally exposed to light. When these two processes were performed, the gel was turned to blue by the formazan. Since, at position of SOD activity, superoxide ions are destroyed and therefore no reduction of tetrazolium occurs, these positions were detected by achromatic bands.

RESULTS AND DISCUSSION

Polymorphism of SODs in the larval hemolymph:

There are three basic families of SOD enzymes: Cu and Zn containing SOD (Cu/Zn-SOD), Mn containing SOD (Mn-SOD) and extracellular SOD (EC-SOD) (Fridovich, 1975). We cloned and sequenced two cDNAs encoding Cu/Zn-SOD and Mn-SOD (Yamamoto *et al.* 2005a; Yamamoto *et al.* 2005b). Although much knowledge about SOD have been accumulated as described above, their heterogeneity has been unclear so far in the insect.

Table I. Polymorphism of SOD in larval hemolymph.

Tableau I. Polymorphisme de SOD dans l'hémolymph larvaire.

No. of isoforms	No. of silkworm strains
<i>Nbre d'isoformes</i>	<i>Nbre de souches de vers à soie</i>
1	38
2	25
3	20
4	17

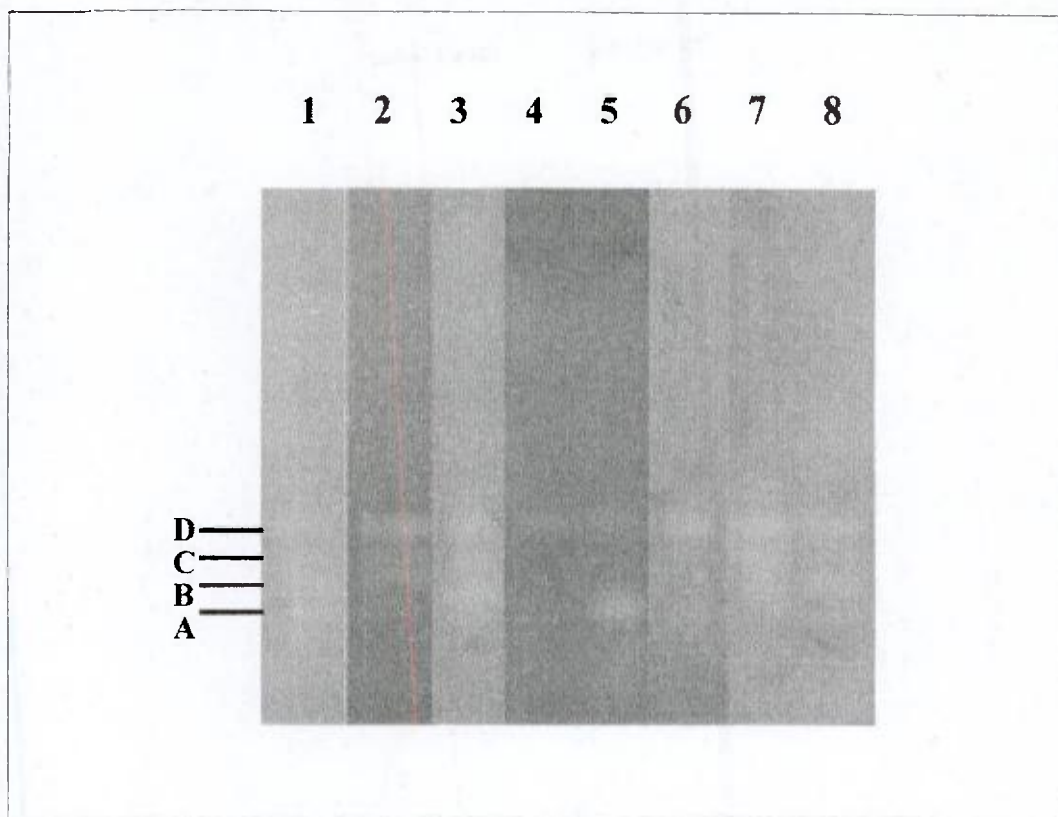


Fig. 1. Zymograms of SOD isoforms.

Hemolymph specimens were applied to native-PAGE followed by the active staining for SOD. Lane 1, w42 strain; lane 2, c55; lane 3, p63; lane 4, p40; lane 5, p50; lane 6, w34; lane 7, w18; lane 8, w20.

Fig. 1. Zymogrammes des isoformes SOD.

On procède à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide des spécimens de l'hémolymph, suivie par une coloration active pour SOD. Trajet 1 : souche w42 ; trajet 2 : c55 ; trajet 3 : p63 ; trajet 4 : p40 ; trajet 5 : p50 ; trajet 6 : w34 ; trajet 7 : w18 ; trajet 8 : w20.

Previously, activity staining for SOD was constructed and performed (Yamamoto *et al.* 2005a). Using this method, polymorphism of SODs in the hemolymph specimens from the larvae of 100 strains of *B. mori* was investigated. Electrophoretic variations in SOD were observed and their representative patterns are shown in Fig. 1. The four types of the SOD were detected in hemolymph samples and were designated as Type A, B, C and D for the former migrated faster toward an anode and the other slower. Hemolymph samples of w42 and p63 strains contained all types of SODs. There were three of four types in hemolymph samples of c55 and w18 strains, whereas those of p40 and w20 contained only type D of SOD. In case of p50, universal strain of the silkworm, there were two types (A and D) in the hemolymph specimen, while w20 contained also two types (B and D). Silkworm strains (up to 100) were surveyed for the banding patterns of SOD by PAGE followed by activity staining. The number of strains containing isozymes are listed in Table I with the variety of SOD species. Previously, we found that Cu/Zn-SOD and Mn-SOD localized intracellular (Yamamoto *et al.* 2005a; Yamamoto *et al.* 2005b).

Fig. 2. Alignment of SOD isozymes.

Fig. 2. Alignement des izozymes SOD.

Alignement des séquences des acides aminés de certains EC-SOD. On obtient la séquence d'EC-SOD de chaque organisme à partir de la base de données : *D. melanogaster* (no. Q95T42), *C. capitata* (Q27460) et *L. niger* (AY672457). Les points représentent les acides aminés identiques. Une barre signifie une délétion.

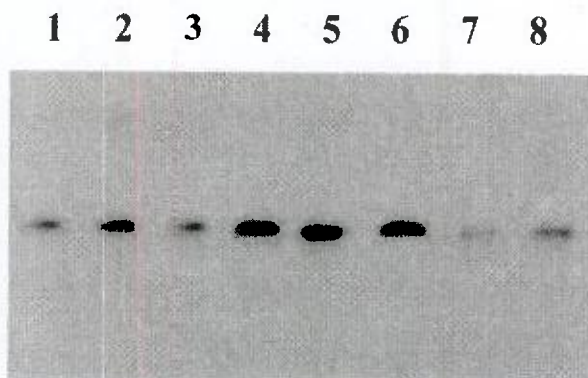


Fig. 3 Detection of G6PD in various strains

Hemolymph specimens were applied to native-PAGE followed by the active staining for G6PD described in Materials and Methods. Lane 1, b03 strain; lane 2, b04; lane 3, b20; lane 4, b22; lane 5, b30; lane 6, b31; lane 7, b32; lane 8, b201.

Fig. 3. Détection de G6PD dans des souches variées

On procède à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide des spécimens d'hémolymphe suivie par une coloration active pour G6PD décrite dans Matériels et Methodes. Trajet 1 : souche b03 ; trajet 2 : b04 ; trajet 3 : b20 ; trajet 4 : b22 ; trajet 5 : b30 ; trajet 6 : b31 ; trajet 7 : b32 ; trajet 8 : b201.

On the other hand, EC-SOD, present in extracellular, has not been examined in the silkworm in comparison with Cu/Zn-SOD and Mn-SOD (Yamamoto *et al.* 2005b). Referring to the sequence of cDNA encoding *Drosophila melanogaster* EC-SOD, the *B. mori* EC-SOD homologue was searched for the SilkBase database (<http://morus.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). We obtained a cDNA fragment and the partial sequencing revealed that it encodes 151 amino acid residues, which was similar to those of EC-SODs from *D. melanogaster* (homology: 59.3 %), *Ceratitis capitata* (homology: 59.0 %) and *Lasius niger* (homology: 57.9 %) (Fig. 2). Complete sequence and characterization of silkworm EC-SOD are now underway in our laboratory. ROS are produced by stimulated immune cells and show various activities in innate immunity in mammalian (Marcinkiewicz *et al.* 2007). ROS influence on organisms directly by oxidizing the membrane lipids, and they also are thought to be intercellular messengers. It is reported that amount of ROS in hemocytes increased in the presence of peptidoglycan, cell wall component of bacteria (Kurokawa *et al.* 2007; Ishii *et al.* 2008). Together, the *B. mori* EC-SOD could play a part in control of the amount of ROS in silkworm hemolymph.

Detection and zymogram of G6PD in the larval hemolymph:

It has been accepted that G6PD is remarkable for its genetic diversity. Firstly, we constructed the activity staining for G6PD for routinely detection on the gel after the Native-PAGE (7.5 %). Briefly, the gel was soaked in 180 ml of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 5 mM MgCl₂, 40 mg of glucose 6-phosphate, 15 mg of NADP⁺, 20 mg of nitroblue tetrazolium and 4 mg of phenazine methosulfate (PMS) in the dark at 30 °C until band appears (Sing and Brewer, 1969). PMS is able to accept electrons from NADPH and reduce tetrazolium salts for production of colored precipitate. By using this method, electrophoretic polymorphism was examined in larval hemolymph of various silkworm strains (Fig. 2). We detected a single G6PD in hemolymph specimens among 100 silkworm strains.

B. mori	1	-	E	D	V	T	V	N	I	K	N	A	C	T	S	S	K	G	F	T	R	V	I	M	E	K	P	F	G	R	D	D	V	S	S	E	K	L	S	N	38
D. melanogaster	1	F	.	E	.	.	.	.	.	Q	I	.	M	.	V	C	.	W	N	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	Q	A	.	.	D	39		
H. sapiens	1	Y	.	A	.	.	K	.	.	H	E	S	.	M	.	Q	I	.	W	N	.	I	.	V	.	.	.	.	.	.	L	Q	.	.	D	R	.	.	.	39	
B. mori	39	B	L	A	G	L	F	I	E	E	Q	I	Y	R	I	D	H	Y	L	G	K	E	M	V	Q	N	L	M	T	I	R	F	A	N	Q	I	F	N	P	A	77
D. melanogaster	40	.	.	.	.	.	Q	.	D	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	K	.	L	S	S	T	78		
H. sapiens	40	.	I	S	S	.	.	R	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	L	.	.	.	R	.	.	G	.	I	78
B. mori	78	W	N	R	E	N	I	A	S	V	L	I	S	F	K	E	P	F	G	T	E	G	R	G	G	Y	F	D	D	F	G	I	I	R	D	V	M	Q	N	H	116
D. melanogaster	79	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	117	
H. sapiens	79	.	.	D	.	.	C	.	I	L	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	117	
B. mori	117	L	L	Q	I	L	S	L	V	A	M	E	K	P	V	T	L	N	P	N	D	I	R	D	E	K	V	K	V	L	R	H	I	Q	P	I	E	L	K	D	155
D. melanogaster	118	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	C	H	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	S	.	E	A	L	T	.	D	.	156	
H. sapiens	118	.	.	M	.	C	.	.	.	.	.	.	A	S	T	.	S	D	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	C	.	S	E	V	Q	A	N	N	156	
B. mori	156	I	L	I	G	Q	Y	V	G	N	P	E	G	Q	G	E	E	-	K	L	G	Y	L	D	D	P	T	V	P	G	D	S	L	T	P	T	Y	A	L	A	193
D. melanogaster	157	M	V	L	.	.	L	.	.	.	Q	.	T	N	D	D	A	R	T	.	V	E	.	.	.	.	.	S	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	G	195	
H. sapiens	157	V	V	L	.	.	.	.	.	.	D	.	E	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	T	.	A	.	F	.	A	V	194	
B. mori	194	T	L	W	I	N	N	A	R	W	Q	G	V	P	F	I	L	R	C	G	K	A	L	N	E	R	K	A	E	V	R	V	Q	Y	K	D	V	P	G	D	232
D. melanogaster	196	V	.	K	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	Q	.	.	L	.	.	.	234		
H. sapiens	195	V	.	Y	V	E	.	E	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	F	H	.	.	A	.	.	233		
B. mori	233	I	F	S	G	H	A	K	R	N	E	L	V	I	R	V	Q	P	G	E	A	L	Y	L	K	M	M	S	K	S	P	G	M	K	P	D	L	.	268		
D. melanogaster	235	.	.	E	.	N	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	.	.	T	.	.	.	I	T	.	.	I	.	.	.	270			
H. sapiens	234	.	.	H	Q	Q	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	V	.	T	.	.	T	.	K	.	.	F	.	N	-	.	.	.	.	268				

Fig. 4. Deduced amino acids of G6PD.

Alignment of amino acid sequences of G6PDs. Sequence of G6PD from each organism was obtained from Swiss-Prot database: *D. melanogaster* (no. P12646) and *H. sapiens* (P11413). Dots represent identical amino acids. A dash denotes a deletion.

Fig. 4. Acides aminés déduits de G6PD.

Alignement des séquences des acides aminés de G6PDS. On obtient la séquence de G6PD de chaque organisme auprès de la banque de données Swiss-Prot : *D. melanogaster* (no. P12646) et *H. sapiens* (P11413). Les points représentent les acides aminés identiques. Une barre signifie une délétion.

Furthermore, the existence of G6PD homologue in silkworm EST database was investigated (Fig. 4). The deduced amino acid sequence of the homologous clone showed highly identities to those of *D. melanogaster* (74.7 %) and *Homo sapiens* (68.2 %). Our results were different with the case of other organisms. It is reported that two enzyme variants of G6PD were detected in *Ips typographus* and *Drosophila melanogaster* (Dolezelová *et al.* 2006; Eanes *et al.* 1993). The two variants of *D. melanogaster* were generated by single amino acid replacements and were distinguished by electrophoretic mobility on native electrophoresis (Eanes *et al.* 1993). There are also G6PD variants in human produced by one or two nucleotide substitution (Hirono *et al.* 1994; Minuccui *et al.* 2007). The resulting variants of human G6PD express enzyme activity with wide-ranging levels and associate with clinical conditions (Hirono *et al.*, 1994). As shown in Fig. 4, we observed the difference in band intensity on the activity staining for G6PD. A small amount activity was detected in homogenates of four strains including b03, b20, b32 and b201. There is variation in values of G6PD activity from strain to strain.

The silkworm, *B. mori*, has been used for breeding for agricultural production, as well as for a model animal of lepidoptera insects. Since many agricultural pests belong to the lepidoptera, genome of silkworm could provide useful information on insect science and industries such as insecticide, pest control, and silk production. In this study, we deal with silkworm SOD and G6PD, which may participate in protection from environmental stresses. SOD isozymes were present, whereas there is difference in expression of the G6PD activity in the larval hemolymph of silkworm strains tested. Further investigation makes it possible to understand the reason why there is a variety of silkworm EC-SOD and G6PD. The database construction of various isozymes and its assignment to visible characters for silkworm mutants are in progress. This research approach will enable us to apply genomic and biochemical studies for other lepidopteran insects including agricultural pests.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Takamizawa, Kawai, Nakajima, Yaguchi, Kakiuchi and Miyamoto at Kyoto Institute of Technology for assistance of some experiments. The current work was partially supported by Kyushu University Interdisciplinary Programs in Education and Projects in Research Development, and by KAKENHI (19780042).

REFERENCES

- BANNISTER J.V., BANNISTER W.H. & ROTILIO G. (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC. Crit. Rev. Biochem.* 22, 111-180.
- BANNO Y., FUJII H., KAWAGUCHI Y., YAMAMOTO K., NISHIKAWA K., NISHISAKA A., TAMURA K. & EGUCHI S. (2005) A guide to the silkworm mutants 2005: Gene name and gene symbol. Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Fukuoka, Japan
- DOLEZELOVÁ E., ZUROVEC M., BÖHMOVÁ M. & SEHNAL F. (2006) Use of two transcription starts in the *G6PD* gene of the bark beetle *Ips typographus*. *Insect Mol. Biol.* 15(1), 25-32.
- EANES W.F., KIRCHNER M. & YOON J. (1993) Evidence for adaptive evolution of the *G6PD* gene in the *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7475-7479.
- EGUCHI M., YOSHITAKE N. & KAI H. (1985) Types and inheritance of blood esterase in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Jpn. J. Genet.* 40, 15-19.
- FUJII H., ARATAKE, DOIRA H. & KOGA K. (1996) Genetic analysis of chymotrypsin inhibitors in the hemolymph of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 65, 334-341.
- FRIDOVICH I. (1975) Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 147-159.
- GAMO T. (1978) Low molecular weight lipoproteins in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*: inheritance, isolation and some properties. *Insect Biochem.* 8, 457-470.

- HIRONO A., MIWA S., FUJII H., ISHIDA F., YAMADA K. & KUBOTA K. (1994) Molecular study of eight Japanese cases of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Blood*. 83 (11), 3363-3368.
- ISHII K., HAMAMOTO H., KAMIMURA M. & SEKIMIZU K. (2008) Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism. *J. Biol. Chem.* 283 (4), 2185-2191.
- JIANG Y., BANNO Y. & FUJII H. (2000) Genetic variant and inheritance of the 35K protease in digestive juice of silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 69, 225-227.
- KIMURA S. (1981) Genetic of insect hemolymph beta-N-acetyl glucosamininase EC. 3.2.1.30 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Genet.* 19, 1-14.
- KUROKAWA K., KAITO C. & SEKIMIZU K. (2007) Two-component signaling in the virulence of *Staphylococcus aureus*: A silkworm larvae-pathogenic agent infection model of virulence. *Methods Enzymol.* 422, 233-244.
- MARCINKIEWICZ J., CISZEK M., BOBEK M., STRUS M., HECZKO P.B., KURNYTA M., BIEDRON R. & CHMIELARCZYK A. (2007) Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *Int. J. Exp. Pathol.* 88 (3), 155-154.
- MCCORD J.M. & FRIDOVICH I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprin). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- MINUCCUI A., CONCOLINO P., ANTENUCCI M., SANTONOCITO C., AMEGLIO F., ZUPPI C., GIARDINA B. & CAPOLUONGO E. (2007) Description of a novel missense mutation of glucose 6-phosphate dehydrogenase gene associated with asymptomatic high enzyme deficiency. *Clin. Biochem.* 40, 856-858.
- NGUU E.K., MASE K., KADONO-OKUDA K., KOSEGAWA E. & HARA W. (2005) Molecular linkage map for the silkworm, *Bombyx mori*, based on restriction fragment length polymorphism of cDNA clones. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 74, 5-13.
- SING C.F. & BREWER G.J. (1969) Isozymes of a polyploid sries of wheat. *Genetics*. 61, 391-398.
- TAN Y., WAN C., ZHU Y., LU C., XIANG Z., et al. (2001) An amplified fragment length polymorphisms map of the silkworm. *Genetics*. 157, 1277-1284.
- YAMAMOTO K., ZHANG P., BANNO Y., FUJII H., MIAKE F., KASHIGE N & ASO Y. (2005a) Superoxide dismutase from the silkworm, *Bombyx mori*: sequence, distribution, and overexpression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (3), 507-514.
- YAMAMOTO K., ZHANG P., HE N., WANG Y., ASO Y., BANNO Y. & FUJII H. (2005b) Molecular and biochemical characterization of manganese-containing superoxide dismutase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 142B, 403-409.
- YASUKOCHI Y. (1998) A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*. 150, 1513-1525.
- WANG Y., ZHANG P., FUJII H., BANNO Y., YAMAMOTO K. & ASO Y. (2004) Proteomic studies of lipopolysaccharide-induced polypeptides in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1821-1823.
- ZHANG P., ASO Y., JIKUYA H., KUSAKABE T., LEE J.M., KAWAGUCHI Y., YAMAMOTO K., BANNO Y. & FUJII H. (2007) Proteomic profiling of the silkworm skeletal muscle proteins during larval-pupal metamorphosis. *J. Proteome Research*. 6, 2295-2303.
- ZHANG P., ASO Y., YAMAMOTO K., BANNO Y., WANG Y., TSUCHIDA K., KAWAGUCHI Y. & FUJII H. (2006) Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics*. 6, 2586-2599.
- ZHANG P., YAMAMOTO K., ASO Y., BANNO Y., SAKANO D., WANG Y. & FUJII H. (2005) Proteomic studies of isoforms of the P25 component of *Bombyx mori* fibroin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2086-2093.

VARIANTS POLYMORPHIQUES DE LA SUPEROXIDE DISMUTASE ET DE LA GLUCOSE 6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE DANS L'HEMOLYMPHE DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI*

HIROSHI FUJII, YUTAKA BANNO & KOHJI YAMAMOTO*

Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581 Japon.

Au cours de la construction de la base de données sur des isozymes variés chez le ver à soie, Bombyx mori, nous avons examiné l'existence des isozymes de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glucose 6-phosphate deshydrogénase (G6PD). Dans cette étude, nous avons mis au point la détection de l'activité pour G6PD. En utilisant cette méthode pour G6PD ainsi que la coloration de l'activité pour SOD, nous avons découvert que les isozymes de SOD sont révélés dans l'hémolymphe larvaire des souches de vers à soie testées, tandis qu'il y a une G6PD unique chez les diverses souches de vers à soie. A notre connaissance, c'est le premier rapport à montrer les zymogrammes de SOD et de G6PD et à identifier un nouveau membre de SOD et de G6PD chez le ver à soie.

INTRODUCTION

Le ver à soie domestiqué, *Bombyx mori*, est un insecte important pour la sériciculture. Puisqu'on a mis au point génétiquement des vers à soie homogènes, on les a utilisés comme animal modèle pour les insectes lépidoptères. On a identifié et maintenu approximativement cinq cent mutants de vers à soie (Banno et coll., 2005), selon les caractères phénotypiques, tels que la forme de l'œuf, la couleur de la peau au stade larvaire et la forme du cocon (<http://kaiko.kyushu-u.ac.jp/index.html>; <http://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/index.jsp>). On a préparé l'analyse de la liaison génétique du ver à soie avec ces caractères par RAPD (Yasukochi, 1998), AFLP (Tan et coll., 2001) et RFLP (Nguu et coll., 2005). Puisque la séquence brouillon du génome du ver à soie est disponible, on a procédé à l'analyse post-génome chez le ver à soie. Nous avons mis au point des recherches protéomiques (Wang et coll., 2004 ; Zhang et coll., 2005 . Zang et coll., 2007) et une base de données résumant ces résultats est disponible (<http://shigen.lab.nig.ac.jp/JSPD:index.jsp>).

Jusqu'à présent, des isozymes multiples ont été identifiés chez le ver à soie, *B. mori*. Par exemple, on a étudié les inhibiteurs de la chymotrypsine (Fujii et coll., 1996), la 35K protéase (Jiang et coll., 2000), les lipoprotéines (Gamo, 1978), les estérases (Eguchi et coll., 1985) et l'acétyl glucosaminase (Kimura, 1981). Pour une meilleure compréhension de la génétique, de la physiologie et de la biochimie du ver à soie, il est utile d'intégrer des informations sur les caractères latents y compris sur les isozymes des caractères visibles chez les mutants du ver à soie. Nous avons donc essayé de

* Auteur auquel adresser la correspondance : Kohji Yamamoto, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japon. Fax : + 81 92 624 1011, E-mail : yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp.

construire une base de données des isozymes chez le ver à soie. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la superoxyde dismutase (SOD) et la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD).

Les SOD sont l'une des défenses enzymatiques contre des espèces réactives à l'oxygène (ROS) telles que l'anion superoxyde (O_2^-) et H_2O_2 , qui sont principalement générées par le métabolisme aérobie. SOD est une métalloenzyme présente dans les organismes aérobiques, qui joue un rôle crucial pour protéger les organismes contre les effets toxiques provoqués par les ROS (McCord et Fridovich, 1969 ; Bannister et coll., 1987). G6PD est une enzyme impliquée dans la catalyse pour la première étape du processus pentose phosphate. G6PD convertit le glucose-6-phosphate en 6-phosphoglucono- δ -lactone et est responsable de la préparation de l'énergie réductrice pour les cellules. Chez l'être humain, la carence en G6PD est courante et provoque une hémolyse aigue en présence d'une simple infection, d'ingestion de haricots, de médicaments, d'antipyrétiques et d'antimalariques. Nous rendons compte ici du polymorphisme de SOD et de G6PD dans l'hémolymphe du ver à soie, *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

Souches de vers à soie et préparation de l'hémolymphe :

Les larves des souches de vers à soie sont maintenues à l'Institut des Ressources Génétiques de l'Université de Kyushu et élevées sur des feuilles de mûrier. On recueille les spécimens d'hémolymphe dans des tubes contenant une petite quantité de phénylthiourée, puis on les stocke à $-80^\circ C$ jusqu'à l'utilisation.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :

On effectue l'électrophorèse native sur gel de polyacrylamide (7,5 %) (Native-PAGE), suivie par une coloration active pour SOD selon Yamamoto et coll., (2005a). Brièvement, après l'électrophorèse sur des gels de polyacrylamide natifs, on visualise la bande correspondant à l'activité SOD par l'incubation des gels dans du tétrazolium nitrobleu et de la riboflavine et on les expose à la lumière. Quand on a réalisé ces deux processus, le gel devient bleu grâce au formazan. Puisqu'à la position de l'activité SOD, les ions de superoxyde sont détruits et qu'il ne se produit donc aucune réduction du tétrazolium, on détecte ces positions par les bandes achromatiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

Polymorphisme de SOD dans l'hémolymphe larvaire :

Il y a trois familles de base des enzymes SOD, les SOD contenant du Cu et du Zn (Cu/Zn-SOD), les SOD contenant du Mn (Mn-SOD) et les SOD extracellulaires (EC-SOD) (Fridovich, 1975). Nous avons cloné et séquencé deux ADNc codant Cu/Zn-SOD et Mn-SOD (Yamamoto et coll., 2005a ; Yamamoto et coll., 2005b). Bien qu'on ait accumulé beaucoup de connaissances sur SOD, comme nous l'avons décrit plus haut, jusqu'à présent leur hétérogénéité n'est pas claire chez l'insecte.

On a déjà mis au point et réalisé la coloration de l'activité de SOD (Yamamoto et coll., 2005a). On a étudié le polymorphisme des SOD dans les spécimens de l'hémolymphe de larves de 100 souches de *B. mori* en utilisant cette méthode. On observe des variations électrophorétiques des SOD et leurs schémas représentatifs sont présentés dans la Fig. 1. On détecte les quatre types de SOD dans les échantillons d'hémolymphe et on les désigne comme Type A, B, C et D, car le premier migre plus vite vers l'anode et les autres plus lentement. Les échantillons d'hémolymphe des souches de w42 et de p63 contiennent tous les types de SOD. Il y en a trois des quatre types dans les échantillons de l'hémolymphe des souches c55 et w18, tandis que ceux de p40 et de w20 ne contiennent que le type D de SOD. Dans le cas de p50, la souche universelle du ver à soie, il y en a deux types (A et D) tandis que w20 en contient aussi deux types (B et D). On a passé en revue des souches de vers à soie (jusqu'à

100) pour les schémas des bandes des SOD par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, suivie par la coloration de l'activité. Le nombre de souches contenant des isozymes est présenté dans le Tableau I avec la variété des espèces SOD. Auparavant, nous avons constaté que Cu/Zn-SOD et Mn-SOD sont localisées à l'intérieur des cellules (Yamamoto et coll., 2005a ; Yamamoto et coll., 2005b).

D'autre part, EC-SOD, qui est présent à l'extérieur des cellules, n'a pas été examiné chez le ver à soie par comparaison à Cu / Zn-SOD et Mn-SOD (Yamamoto et coll., 2005b). En ce qui concerne la séquence d'ADNc, qui code EC-SOD de *Drosophila melanogaster*, on a cherché l'homologue EC-SOD de *B. mori* dans la base de données Silk Base (<http://morus.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). Nous avons obtenu un fragment d'ADNc et le séquençage partiel révèle qu'il code 151 résidus d'acides aminés, qui est similaire à ceux des EC-SOD de *D. melanogaster* (homologie : 59,3 %), de *Ceratitis capitata* (homologie : 59 %) et de *Lasius niger* (homologie : 57,9 %) (Fig. 2). La séquence et la caractérisation complètes de l'EC-SOD du ver à soie sont maintenant en cours dans notre laboratoire. Les ROS sont produites par les cellules immunisées stimulées et présentent des activités variées dans l'immunité innée chez les mammifères (Marcinkiewicz et coll., 2007). Les ROS ont une influence directe sur les organismes en oxydant les lipides de la membrane et on pense aussi qu'ils sont des messagers intracellulaires. On a rapporté que la quantité de ROS dans les hémocytes augmente en la présence de peptidoglycan, le composant de la paroi cellulaire des bactéries (Kurokawa et coll., 2007 ; Ishii et coll., 2008). L'EC-SOD de *B. mori* pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la quantité de ROS dans l'hémolymphe du ver à soie.

Détection et zymogramme de G6PD dans l'hémolymphe larvaire :

On sait que G6PD est remarquable de par sa diversité génétique. En premier lieu, nous avons mis au point la coloration de l'activité de G6PD pour la détection routinière sur gel après la Native – PAGE (7,5 %). En bref, on imprègne le gel dans 180 ml de 0,1 M Tris-HCl (pH de 7,5) contenant 5 mM de $MgCl_2$, 40 mg de glucose 6-phosphate, 15 mg de $NADP^+$, 20 mg de nitrobleu tetrazolium et 4 mg de méthosulfate de phénazine (PMS) dans l'obscurité à 30° C jusqu'à ce que la bande apparaisse (Sing et Brewer, 1969). PMS est capable d'accepter les électrons de NADPH et de réduire les sels de tetrazolium pour la production d'un précipité coloré. En utilisant cette méthode, on examine le polymorphisme électrophorétique dans l'hémolymphe larvaire de diverses souches de ver à soie (Fig. 2). Nous avons détecté un G6PD unique dans les spécimens d'hémolymphe parmi les 100 souches de vers à soie. De plus, nous avons étudié l'existence d'un homologue de G6PD dans la base de données EST du ver à soie (Fig. 4). La séquence en acides aminés déduite du clone homologue montre de fortes identités avec celles de *D. melanogaster* (74,7 %) et de *Homo sapiens* (68,2 %). Nos résultats sont différents dans le cas d'autres organismes. Il y a eu des rapports sur deux variants de l'enzyme de G6PD chez *Ips typographus* et *Drosophila melanogaster* (Dolezelová et coll., 2006 ; Eanes et coll., 1993). Les deux variants de *D. melanogaster* sont générés par des remplacements d'un acide aminé unique et se distinguent par la mobilité électrophorétique sur électrophorèse native (Eanes et coll., 1993). Il y a aussi des variants de G6PD chez l'être humain, produits par une ou deux substitutions de nucléotides (Hirono et coll., 1994 ; Minuccui et coll., 2007). Les variants provenant du G6PD humain expriment une activité à des niveaux très variés et sont associés aux conditions cliniques (Hirono et coll., 1994). Comme le montre la Fig. 4, nous avons observé une différence d'intensité de la bande lors de la coloration de l'activité pour G6PD. On détecte une petite quantité d'activité dans les homogénats de quatre souches dont b03, b20, b32 et b201. Il y a une variation des valeurs de l'activité G6PD d'une souche à l'autre.

Le ver à soie, *B. mori* est utilisé pour le lignage pour la production agricole, ainsi que comme animal modèle pour les insectes lépidoptères. Puisque de nombreux parasites agricoles appartiennent aux lépidoptères, le génome du ver à soie pourrait apporter des informations utiles pour la science et les industries des insectes, telles que les insecticides, la lutte contre les parasites et la production de soie. Dans cette étude, nous nous sommes penchés sur SOD et G6PD chez le ver à soie, qui pourraient participer à la protection contre les stress environnementaux. Les isozymes SOD sont présents, tandis

qu'il y a une différence d'expression de l'activité G6PD dans l'hémolymph larvaire des souches de ver à soie testées. Des études supplémentaires pourraient permettre de comprendre la raison pour laquelle il existe des EC-SOD et G6PD variés chez le ver à soie. La construction d'une base de données sur les divers isozymes ainsi que son rapprochement avec des caractères visibles des mutants du ver à soie est en cours. Ce type d'approche nous permettra de tirer des applications des études génomiques et biochimiques pour d'autres insectes lépidoptères y compris des parasites agricoles.

EFFECT OF CHOLESTEROL SUPPLEMENTATION THROUGH LEAF DIET ON THE NUTRITION AND ECONOMIC CHARACTERS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

FIRDOSE AHMAD MALIK & Y. SRINIVASA REDDY*

Department of Studies in Sericultural Science, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore - 570 006, India.

The nutritional and economic parameters were studied in the silkworm fed with 0.01, 0.1, and 0.5M doses of cholesterol fortified leaf on 1st, 3rd and 5th days of 5th instar larval development. Increased absorption of cholesterol reduced the quantities of leaf ingested and digested and increased efficiency of conversion of ingested food (ECI) and efficiency of conversion of digested food (ECD). ECI and ECD increased by cholesterol induced feed conversion efficiency in the silkworm. The economy of feeding activity by optimal utilization of available nutrients is evident by voluntary curtailment of food consumption. Growth rates increased despite lower ingestion and digestion levels of leaf due to decrease in coefficient of metabolism. The forced co-absorption of higher fatty acids in the leaf diet with cholesterol brings down coefficient of metabolism through savings on metabolic energy required for their synthesis. A significant reduction in larval duration was observed through curtailment of the growth period and maturation time by cholesterol induced ecdysteroid synthesis. A similar increase in cocoon productivity and reproductive potential observed upon cholesterol treatment suggests the importance of cholesterol not only for the growth and development but also for silk and egg production and embryonic development. A significant increase in fecundity and hatching percentage was observed on account of steroid support for viable egg production and embryonic development.

Keywords: *Bombyx mori*, mulberry, cholesterol, nutritional indices, economic characters.

INTRODUCTION

Insects cannot synthesize steroids essential for lipid metabolism and ecdysteroid synthesis (Clayton, 1964; Svoboda and Thompson, 1985). Cholesterol is the dominant tissue sterol even in phytophagous insects, though plants rarely contain it at appreciable levels. Endogenous cholesterol is produced in the silkworm by modifying the sterol components of the mulberry leaves. Sitosterol in mulberry leaves has a high nutritive value, since it can be converted to cholesterol through 24-dealkylation pathway reported to be active in the larvae of *Bombyx mori* (Ikekawa *et al.*, 1993; Short *et al.*, 1996). The two intermediates in β -sitosterol dealkylation process i. e., fucosterol and desmosterol were very effective for the maintenance of good larval growth (Ito and Arai, 1967). The growth of the larvae is impaired by the sterol deficient diet (Shinji *et al.*, 2006).

The growth promoting effect of cholesterol could be largely attributed to the ecdysteroid synthesized from it by the prothoracic glands. Ecdysteroids play a significant role in insect growth

* Correspondence to: Prof. Y. Srinivasa Reddy, DOS in Sericultural Science, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore - 570 006, Fax: 0091821-2419335;

and development including moulting and metamorphosis (Smith, 1985; Sehnaal, 1989; Gilbert *et al.*, 2002). A differential basal ecdysteroid level is maintained during larval growth (Sehnaal, 1989). The relatively high ecdysteroid levels during early stages of the penultimate instar stimulate corpora allata to higher levels of synthesis of juvenile hormone essential for larval growth (Gu and Chow, 1996). Precocious metamorphosis is induced when ecdysteroid production is reduced artificially as corpora allata stop producing juvenile hormone (Gu *et al.*, 2000).

Ecdysteroids are useful for maintaining high juvenile hormone during intermoult period and inducing moulting and metamorphosis at the end of growth phase by their higher haemolymph titer levels. The steroidogenic capability of prothoracic glands varies significantly at different larval growth periods on account of its variable sensitivity to prothoracicotrophic hormone (PTTH) and cyclic AMP (cAMP). Though fluctuations of haemolymph PTTH levels occur in penultimate and last larval instars of *B. mori* (Gu *et al.*, 2000), PTTH levels always exist during larval growth period (Dai *et al.*, 1995).

The *in-vitro* ecdysteroidogenic competency of PTTH varies significantly at different growth periods of 4th instar silkworm (Gu *et al.*, 2000). The so-called phytoecdysteroids (Trivedy *et al.*, 2003a; Trivedy *et al.*, 2003b; Nirmal Kumar *et al.*, 2006), which are essentially phytosterols were utilized to synchronize spinning activity of the larvae during mass rearing of the mulberry silkworm. The time of application of phytosterols for the steroidogenic synchronized spinning activity is important in view of a significant variability in the steroidogenic competency of prothoracic glands at different larval growth periods.

Cholesterol is a dominant sterol that accumulates in eggs regardless of dietary sterol components (Ba *et al.*, 1995; Behmer *et al.*, 1999). Ichimasa (1976) found that in the silkworm, the accumulation of sterol esters was higher in diapause than in non-diapause ovaries. Cholesterol is transported from the fat body to the eggs through lipophorin in a temperature dependent aqueous diffusion mode of action (Jouni *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2002). 90% reduction in haemolymph cholesterol titers by dietary intervention brought about 10-20% reduction in egg production in adult female *Locusta migratoria* (Costet *et al.*, 1987). In the eggs laid, ecdysteroid content varied and severe developmental abnormalities were observed (Behmer and Ness, 2003). In view of the importance of the ecdysteroids in the larval growth and embryonic development, the effects of exogenous cholesterol on a number of nutritive parameters and economic traits in the silkworm, *Bombyx mori* were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm rearing:

MGM851, a newly evolved productive bivoltine silkworm race, was utilized in the present investigation. Four disease free layings (DFLs) of the race were brushed and reared as per the standard rearing technique of Dandin, *et al.* (2003). Fresh mulberry leaves of V-1 variety were used for feeding the larvae. The freshly moulted 5th instar larvae were grouped into four batches, each batch having three replications of 50 larvae and reared at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\%$ RH.

Cholesterol treatment:

Cholesterol (procured from Sisco Research laboratories Ltd., Mumbai, India) was dissolved in a small quantity of chloroform and diluted with ethyl alcohol to 0.01, 0.1 and 0.5M concentrations. The mulberry leaf was smeared on the ventral surface with 1 ml solution and after drying fed to 5th instar larval stage. The cholesterol-smeared leaf was offered first on the day of treatment, and after the leaf was fed upon completely by the group of 50 larvae, untreated leaf was provided *ad libitum*. The batch-1 larvae are considered as carrier control as the larvae were fed with normal mulberry leaf sprayed with ethyl alcohol aliquots. However, the other three batches containing fifty larvae each (in three replicates) were fed on the three doses of uniformly smeared cholesterol treated leaves on 1st,

3rd and 5th days. Cholesterol supplemented leaf was provided during the 1st feeding on the day of treatment. A total of three feedings were provided every day.

Nutritional indices:

Fresh leaves of mulberry were cut through midrib into two symmetrical halves; one half was used to find out the moisture content of the leaf (Delvi and Pandian, 1972) and the other half was weighed and smeared with known volume of cholesterol. Equal and known quantity of leaf was offered to all silkworm batches, taking into consideration the consumption levels on each day of 5th instar stage of larval development. The left over leaves and the excreta were dried in a hot air oven at 80^o C till constant weight and the values were recorded. The initial and final wet and dry weights of larvae were recorded everyday. Daily food consumption and utilization were recorded by following the standard gravimetric method (Waldbauer, 1968). The dry weights of leaf ingested and digested by each larva were calculated and the nutritional indices such as approximate digestibility (AD), efficiency of converting leaf ingested (ECI) and leaf digested (ECD) into larval body substance, consumption index (CI), growth rate (GR) and coefficient of metabolism (COM) were calculated as per the empirical formulae provided by Waldbauer (1968).

Leaf ingested:

Leaf ingested is the amount of leaf consumed by the larva expressed in 24 h period.

Leaf ingested = Dry weight of the leaf offered – Dry weight of left over leaf

Leaf digested:

Leaf digested is the amount of leaf assimilated by the larva in a 24 h period.

Leaf digested = Dry weight of leaf ingested – Dry weight of excreta

Efficiency of conversion of ingested food (ECI):

The efficiency of conversion of ingested food to body substance (ECI) is the percentage of ingested food contributing to weight gain of the larva

$$ECI = \frac{\text{Dry weight gained by larva}}{\text{Dry weight of food ingested}} \times 100$$

Efficiency of conversion of digested food (ECD):

The efficiency with which digested food is converted to body substance (ECD) is the percentage of digested food contributing to weight gain of the larva

$$ECD = \frac{\text{Dry weight gained by larva}}{\text{Dry weight of food digested}} \times 100$$

Approximate digestibility (AD):

Approximate digestibility is the percentage of the ingested food subjected to digestion and absorption in midgut.

$$AD = \frac{\text{Weight of food digested}}{\text{Weight of food ingested}} \times 100$$

Consumption index (CI):

Consumption index is the quantity of food consumed for a unit increase in the mean weight of the larva.

$$CI = \frac{\text{Dry weight of food consumed}}{\text{Duration of feeding period} \times \text{Mean dry weight of larva during feeding period}}$$

Growth rate (GR):

Growth rate is the weight gain per each day during larval growth period.

$$GR = \frac{\text{Dry weight gain of larva during feeding period}}{\text{Duration of feeding period} \times \text{Mean dry weight of larva during feeding period}}$$

Coefficient of metabolism (COM):

Coefficient of metabolism is the fraction of digested food required for metabolic activity producing the manifested weight gain.

$$COM = \frac{\text{Weight of food digested} - \text{Increase in weight of larva}}{\text{Weight of food digested}}$$

The cocoon harvested was utilized for calculating cocoon weight, shell weight and shell percentage and also fecundity and hatching percentage.

Cocoon yield:

Cocoon yield were calculated by using the formula:

$$\text{Cocoon yield (kg/ 100 DFLs)} = \frac{\text{CYR} \times \text{EH} / 100 \times 40,000}{\text{NLR}} \times 100$$

Where,

CYR = Cocoon yield per replication

EH = Egg hatching percentage

NLR = No. of larvae per replication

Silk gland somatic index:

Silk gland somatic index is the weight of the silk gland expressed as percentage of mature larval weight. The weight of the silk gland in the 5th instar larvae is largely contributed by the quantity of the silk synthesized and accumulated in the lumen of the silk gland.

$$\text{Silk gland somatic index} = \frac{\text{Silk gland weight (g)}}{\text{Mature larval weight (g)}} \times 100$$

Economics of silkworm rearing:

The economics of rearing utilizing 0.01, 0.1, and 0.5M concentrations of cholesterol on days 1st, 3rd and 5th of 5th instar larvae was calculated taking into consideration leaf consumption, the cost of the chemical and other costs of rearing. The total cost of rearing 100 DFLs includes other costs (Table IV) and the costs of leaf and chemical. The current leaf cost of Rs.7.5/kg dry weight of the leaf, cocoon cost of Rs.250/kg and chemical cost of Rs.1000/100g were used for the calculation. Dry weights of the leaf were used for calculating total consumption and cost of the leaf. Assuming that the consumption level during 5th instar is 80.0% (Dandin *et al.*, 2003), a corrective factor of 104 kgs which is equivalent to 20 % of 419 kgs of dry leaf weight consumed by untreated larvae was added

to the values of leaf consumption of 5th instar in all the three treatments to get values of total leaf consumption of all the instars (Table III).

Statistical analyses:

Analysis of variance was used to test the significance of differences in the means of rates and efficiencies of food utilization and economic characters of the silkworm fed with cholesterol treated leaves. Tukeys (1953) multiple comparison tests were used to find the significance of differences between the treatments. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

The following nutritional parameters were calculated after feeding 5th instar silkworms on 1st, 3rd and 5th days with 0.01, 0.1 and 0.5 M cholesterol supplemented leaf (Table I-II).

Leaf ingested:

The amounts of leaf ingested increased significantly from 1st day to 6th day in untreated larvae (Control). The amounts of leaf ingested were less on days 1 and 3 when cholesterol supplemented leaf was provided but relatively greater decreases were observed on the following days namely 2nd and 4th day (Table I). The per cent decreases observed in the amount of leaf ingested when cholesterol supplemented leaf was provided on 5th day i. e., 24.88, 28.23 and 34.93 at 0.01, 0.1 and 0.5M cholesterol concentrations were significantly higher than the decreases observed on other days. The amounts of leaf ingested were lower at higher doses of cholesterol. The mean decreases in the total amounts of leaf ingested were 14.66, 18.10 and 24.40 in 0.01, 0.1 and 0.5M doses of cholesterol respectively (Table II).

Leaf digested:

Cholesterol supplementation resulted in a greater decrease in the amount of leaf digested than the leaf ingested. The decrease in the amount of leaf digested was greater at higher doses of cholesterol application and observed not only on the days of cholesterol supplementation but also on the following days when only untreated leaf was provided. The per cent decreases observed in the amounts of leaf digested on 5th day i. e., 37.09, 40.04 and 48.34 at 0.01, 0.1 and 0.5M cholesterol concentration were relatively higher and highly significant. The per cent decreases in the total quantity of leaf digested were 21.05, 25.68 and 32.85 at 0.01, 0.1 and 0.5M cholesterol concentration respectively (Table II).

ECI and ECD:

The values of ECI were lower than the corresponding ECD values. Both ECI and ECD increased significantly after cholesterol supplementation (Table I). The increase in ECI and ECD values on 5th day were relatively higher than on other days. Also, higher ECI and ECD values were observed at higher concentration of cholesterol.

Approximate digestibility:

Approximate digestibility was very high on day 1 and dropped significantly on day 2. A consistent increase in approximate digestibility was observed from day 3 to day 6 in control. The approximate digestibility was lower in cholesterol treated batches and the relative decrease was more on day 5 than on the other days.

Growth rate:

Growth rate of larvae increased consistently from day 1-5 and fell significantly on day 6 in control. The growth rate was significantly higher in cholesterol treated batches. The growth rates were higher at higher concentration of cholesterol.

Table I. Effect of cholesterol supplementation on nutritional indices of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Each value is the mean $\pm$ SD of three separate observations).
 Tableau I. Effet du complément en cholestérol sur les indices nutritionnels du ver à soie, *Bombyx mori* L. (chaque valeur est la moyenne $\pm$ l'écart type de trois observations séparées).

Treatments Days		Nutritional parameters							
		Leaf ingested	Leaf digested	ECI	ECD	AD	GR	CI	COM
Traitements / Jours		Paramètres nutritionnels							
		Feuilles ingérées	Feuilles digérées						
Treatments / Traitements									
Control / Témoin		1.46 ± 0.76 ^d	1.05 ± 0.58 ^d	7.58 ± 4.64 ^a	10.6 ± 6.34 ^a	71.4 ± 5.15 ^d	0.32 ± 0.19 ^a	4.45 ± 1.36 ^d	0.90 ± 0.07 ^c
0.01M		1.26 ± 0.59 ^c	0.82 ± 0.44 ^c	9.45 ± 6.84 ^b	15.2 ± 11.4 ^b	66.1 ± 6.64 ^c	0.36 ± 0.18 ^b	3.92 ± 1.41 ^c	0.85 ± 0.10 ^b
0.1M		1.20 ± 0.55 ^b	0.78 ± 0.41 ^b	10.3 ± 7.25 ^c	16.6 ± 12.5 ^c	64.5 ± 6.34 ^b	0.37 ± 0.18 ^b	3.84 ± 1.42 ^b	0.82 ± 0.12 ^a
0.5M		1.10 ± 0.49 ^a	0.70 ± 0.38 ^a	11.5 ± 7.49 ^d	18.4 ± 14.0 ^d	63.4 ± 8.77 ^a	0.39 ± 0.20 ^c	3.68 ± 1.35 ^a	0.81 ± 0.12 ^a
F-value / Valeur F		5986.5	4897.7	184372.7	181580.4	145.0	82.2	258.1	135.0
Interaction	Days / Jours								
Control Témoin	Day 1 / Jour 1	0.37 ± 0.01	0.29 ± 0.01	2.38 ± 0.01	7.32 ± 0.01	78.4 ± 0.58	0.14 ± 0.01	2.87 ± 0.01	0.93 ± 0.02
	Day 2 / Jour 2	0.84 ± 0.01	0.53 ± 0.01	4.36 ± 0.01	3.77 ± 0.02	63.1 ± 0.44	0.18 ± 0.01	5.60 ± 0.01	0.98 ± 0.01
	Day 3 / Jour 3	1.26 ± 0.01	0.86 ± 0.01	5.56 ± 0.01	8.14 ± 0.01	68.3 ± 0.14	0.31 ± 0.01	6.46 ± 0.02	0.94 ± 0.01
	Day 4 / Jour 4	1.62 ± 0.01	1.14 ± 0.01	6.06 ± 0.05	16.7 ± 0.01	70.4 ± 0.10	0.57 ± 0.02	4.98 ± 0.01	0.85± 0.01
	Day 5 / Jour 5	2.09 ± 0.01	1.51 ± 0.01	15.4 ± 0.01	21.2 ± 0.01	72.3 ± 0.72	0.56 ± 0.01	3.59 ± 0.02	0.79 ± 0.01
	Day 6 / Jour 6	2.55 ± 0.01	1.94 ± 0.01	11.7 ± 0.01	6.70 ± 0.10	76.0 ± 0.43	0.16 ± 0.01	3.18 ± 0.01	0.93 ± 0.01
0.01M	Day 1 / Jour 1	0.34 ± 0.01	0.25± 0.01	2.92 ± 0.02	12.8 ± 0.01	73.6 ± 5.11	0.22 ± 0.02	2.55 ± 0.01	0.87 ± 0.02
	Day 2 / Jour 2	0.76 ± 0.01	0.45 ± 0.01	5.11 ± 0.01	4.22 ± 0.02	59.0 ± 0.31	0.26 ± 0.01	4.57 ± 0.41	0.96 ± 0.02
	Day 3 / Jour 3	1.17 ± 0.01	0.72 ± 0.01	5.93 ± 0.01	8.75 ± 0.01	61.4 ± 0.19	0.34 ± 0.01	6.25 ± 0.02	0.93 ± 0.01
	Day 4 / Jour 4	1.50 ± 0.01	1.01 ± 0.02	7.47 ± 0.02	18.8 ± 0.02	67.6 ± 0.58	0.59 ± 0.01	4.68 ± 0.02	0.81 ± 0.02
	Day 5 / Jour 5	1.59 ± 0.01	0.95 ± 0.01	22.8 ± 0.01	37.9 ± 0.02	60.5 ± .90	0.60 ± 0.01	2.63 ± 0.02	0.65 ± 0.01
	Day 6 / Jour 6	2.11 ± 0.01	1.57 ± 0.01	12.5 ± 0.01	8.98 ± 0.01	74.4 ± 0.72	0.17 ± 0.01	2.81 ± 0.02	0.87 ± 0.02

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

Treatments Days		Nutritional parameters							
		Leaf ingested	Leaf digested	ECI	ECD	AD	GR	CI	COM
Traitements / Jours		Paramètres nutritionnels							
		Feuilles ingérées	Feuilles digérées						
Interaction	Days / Jours								
0.1M	Day 1 / Jour 1	0.33 ± 0.01	0.23 ± 0.01	3.12 ± 0.02	13.4 ± 0.02	70.0 ± 0.51	0.22 ± 0.02	2.53 ± 0.02	0.86 ± 0.01
	Day 2 / Jour 2	0.74 ± 0.01	0.42 ± 0.01	5.91 ± 0.01	5.21 ± 0.03	56.8 ± 1.84	0.26 ± .020	4.70 ± 0.10	0.95 ± 0.02
	Day 3 / Jour 3	1.15 ± 0.01	0.68 ± 0.01	6.13 ± 0.02	9.75 ± 0.02	59.1 ± 1.38	0.36 ± 0.02	6.15 ± 0.02	0.91 ± 0.01
	Day 4 / Jour 4	1.43 ± 0.01	0.97 ± 0.01	8.98 ± 0.01	20.6 ± 0.01	68.0 ± 0.95	0.61 ± 0.02	4.4 ± 0.01	0.79 ± 0.01
	Day 5 / Jour 5	1.51 ± 0.01	0.90 ± 0.01	24.3 ± 0.01	41.6 ± 0.02	59.9 ± 0.54	0.60 ± 0.01	2.47 ± 0.02	0.59 ± 0.02
	Day 6 / Jour 6	2.00 ± 0.01	1.46 ± 0.01	13.5 ± 0.01	9.20 ± 0.10	73.0 ± 0.44	0.18 ± 0.01	2.71 ± 0.01	0.83 ± 0.02
0.5M	Day 1 / Jour 1	0.32 ± 0.01	0.23 ± 0.01	4.39 ± 0.01	14.1 ± 0.02	71.6 ± 0.52	0.22 ± 0.01	2.40 ± 0.01	0.85 ± 0.01
	Day 2 / Jour 2	0.71 ± 0.01	0.40 ± 0.01	6.24 ± 0.02	6.44 ± 0.01	56.5 ± 0.35	0.26 ± 0.02	4.65 ± 0.01	0.94 ± 0.01
	Day 3 / Jour 3	1.12 ± 0.01	0.58 ± 0.01	7.98 ± 0.01	10.3 ± 0.01	51.6 ± 0.25	0.40 ± 0.01	5.90 ± 0.01	0.90 ± 0.01
	Day 4 / Jour 4	1.25 ± 0.01	0.85 ± 0.01	9.86 ± 0.01	22.4 ± 0.02	68.0 ± 0.71	0.67 ± 0.02	4.06 ± 0.02	0.78 ± 0.02
	Day 5 / Jour 5	1.36 ± 0.01	0.78 ± 0.01	26.2 ± 0.01	46.8 ± 0.01	57.7 ± 0.37	0.62 ± 0.01	2.39 ± 0.02	0.58 ± 0.01
	Day 6 / Jour 6	1.84 ± 0.02	1.37 ± 0.02	14.3 ± 0.02	10.3 ± 0.02	74.8 ± 0.75	0.19 ± 0.01	2.69 ± 0.01	0.82 ± 0.02
F-value Valeur F	779.5	512.5	2894.1	42334.5	15.14	4.82	13.7	12.2	

Means with different superscripts are significantly different from each other for various treatments (as indicated by Tukeys HSD) / Les moyennes avec différents exposants sont significativement différentes les unes des autres pour les divers traitements (comme l'indique l'HSD de Tukeys). ECI- Efficiency of conversion of ingested food / Efficacité de conversion de la nourriture ingérée, ECD- Efficiency of conversion of digested food / Efficacité de conversion de la nourriture digérée, AD- Approximate digestibility / Digestibilité approximative, GR- Growth rate / Taux de croissance, CI- Consumption index / Indice de consommation, COM- Coefficient of metabolism / Coefficient de métabolisme.

Table II. Percent changes in the nutritional indices of the silkworm, *Bombyx mori* L at the three selected doses of cholesterol.

Tableau II. Changements en pourcentage des indices nutritionnels du ver à soie, Bombyx mori L. avec les trois doses de cholestérol sélectionnées.

Treatments/ Days		Nutritional parameters							
		Leaf ingested	Leaf digested	ECI	ECD	AD	GR	CI	COM
Traitements / Jours		Paramètres nutritionnels							
		Feuilles ingérées	Feuilles digérées						
0.01M	Day 1 Jour 1	-8.11	-13.79	22.69	74.59	-6.05	57.14	-11.15	-6.45
	Day 2 Jour 2	-9.52	-15.09	17.2	11.94	-6.44	44.44	-18.39	-2.04
	Day 3 Jour 3	-7.14	-16.28	6.65	7.49	-10.11	9.68	-3.25	-1.06
	Day 4 Jour 4	-7.41	-11.4	23.27	12.84	-4.09	3.51	-6.02	-4.71
	Day 5 Jour 5	-23.92	-37.09	48.11	78.81	-16.25	7.14	-26.74	-17.72
	Day 6 Jour 6	-17.25	-19.07	6.56	34.03	-2.07	6.25	-11.64	-6.45
	Day 1 Jour 1	-10.81	-20.69	31.09	82.51	-10.69	57.14	-11.85	-7.53
	Day 2 Jour 2	-11.9	-20.75	35.55	38.2	-10.02	44.44	-16.07	-3.06
	Day 3 Jour 3	-8.73	-20.93	10.25	19.78	-3.46	16.13	-4.8	-3.19
	Day 4 Jour 4	-11.73	-14.91	48.18	23.7	-3.46	7.02	-10.04	-7.06
0.1M	Day 5 Jour 5	-27.75	-40.4	58.26	96.18	-17.08	7.14	-31.2	-25.32
	Day 6 Jour 6	-21.57	-24.74	15.17	37.31	-3.97	12.5	-14.78	-10.75
0.5M	Day 1 Jour 1	-13.51	-20.69	84.45	92.08	-8.68	57.14	-16.38	-8.6
	Day 2 Jour 2	-15.48	-24.53	43.12	70.82	-10.38	44.44	-16.96	-4.08
	Day 3 Jour 3	-11.11	-32.56	43.53	26.04	-24.44	29.03	-8.67	-4.26
	Day 4 Jour 4	-22.84	-25.44	62.71	34.07	-3.45	17.54	-18.47	-8.24
	Day 5 Jour 5	-34.93	-48.34	70.61	120.72	-20.08	10.71	-33.43	-26.58
	Day 6 Jour 6	-27.84	-29.38	21.65	53.43	-1.59	18.75	-15.41	-11.83

Consumption index:

Consumption index was low on day 1 and increased significantly on days 2 and 3 but decreased from days 4-6 in control. The consumption indices of larvae fed with cholesterol treated leaf were lower than the corresponding control. The decreases in the consumption indices were more at higher cholesterol concentrations. Also, the decreases observed on day 5 in treated batches were found to be significantly higher than other days of treatment.

Coefficient of metabolism:

Coefficient of metabolism was high on days 1-3 but decreased on days 4 and 5 in control. A significant increase in coefficient of metabolism was noticed on day 6 in control. The coefficients of metabolism in treated larvae were found to be lower in silkworms feeding on cholesterol supplemented leaf. The decreases in coefficients of metabolism were relatively higher at higher doses of cholesterol. Also, the decreases in coefficients of metabolism observed on day 5 in the three cholesterol concentrations were significantly higher than those on other days.

Economic characters:

The data on selected economic characters of the silkworm fed with cholesterol treated mulberry leaf are presented in Table III.

Larval duration:

The larval duration was significantly reduced from 162 h in control to 146 h, 150 h and 149 h at 0.5, 0.01 and 0.1M cholesterol concentrations respectively.

Larval weight:

The larval weight increased significantly from 4.73 g in control to 5.16 g in 0.01M cholesterol fed silkworms. The larval weight tends to decrease at higher cholesterol concentration though the difference in larval weight between the treatments (0.1 and 0.5M) was not statistically significant.

Silk gland weight:

A higher increase in the silk gland weight was observed on cholesterol concentration of 0.1M (27.36 %) and 0.01M (18.87%) than at 0.5M (8.49 %).

Silk gland somatic index:

Silk gland, which constituted 22.3 % of the body mass in control. The silk gland somatic index increased to 24.3% and 27.1 % at 0.01 and 0.1M cholesterol concentrations but only to 23.3 % at 0.5M concentration.

Cocoon weight:

Cocoon weight increased significantly from 1.637 g in control to 1.773 g in 0.01M cholesterol treated silkworms. Though higher increases were observed at higher cholesterol concentrations, the difference in cocoon weight among the treated batches were not found to be statistically significant,

Shell weight:

Shell weight increased from 0.318 g in control to 0.382 g and 0.393 g at 0.01 and 0.1M cholesterol concentrations which were relatively higher than the shell weight of 0.375 g observed at the next higher concentration (0.5M).

Table III. Effect of cholesterol supplementation on economic characters of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Each value is the mean $\pm$ SD of 3 separate observations)

Tableau III. Effet du complément en cholestérol sur les caractères économiques du ver à soie *Bombyx mori* L. (chaque valeur est la moyenne $\pm$ l'écart type de 3 observations séparées).

Treatments	Economic characters									
	5 th instar larval duration	Larval Weight	Silk gland Weight	Silk gland Somatic Index	Cocoon Weight	Shell Weight	Shell Ratio	Pupation rate	Fecundity eggs/ laying	Hatching
Traitements	Caractères économiques									
	Durée du 5 ^{ème} âge larvaire (h)	Poids larvaire (g)	Poids de la glande séricigène (g)	Indice somatique de la glande séricigène (%)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Taux de nymphose (%)	Fécondité des oeufs / ponte	Ecllosion (%)
Control Témoin	162 ^c $\pm$ 0.28	4.73 ^a $\pm$ 0.062	1.06 ^a $\pm$ 0.001	22.3 ^a $\pm$ 0.31	1.637 ^a $\pm$ 0.001	0.318 ^a $\pm$ 0.006	19.4 ^a $\pm$ 0.37	82.7 ^a $\pm$ 2.08	578 ^a $\pm$ 8.1	84.7 ^a $\pm$ 4.50
0.01M	150 ^b $\pm$ 0.48 (-7.41)	5.16 ^b $\pm$ 0.001 (9.09)	1.26 ^c $\pm$ 0.019 (18.87)	24.3 ^c $\pm$ 0.36 (8.97)	1.773 ^d $\pm$ 0.001 (7.93)	0.382 ^b $\pm$ 0.006 (20.13)	21.5 ^b $\pm$ 0.34 (0.82)	95.0 ^b $\pm$ 1.00 (14.87)	625 ^b $\pm$ 4.5 (8.13)	96.0 ^b $\pm$ 1.00 (13.34)
0.1M	149 ^b $\pm$ 0.50 (-8.02)	5.00 ^c $\pm$ 0.002 (5.71)	1.35 ^d $\pm$ 0.015 (27.36)	27.1 ^d $\pm$ 0.28 (21.52)	1.734 ^b $\pm$ 0.001 (5.49)	0.393 ^c $\pm$ 0.005 (23.58)	22.7 ^c $\pm$ 0.28 (17.01)	98.0 ^c $\pm$ 1.00 (18.50)	695 ^d $\pm$ 6.5 (20.24)	99.3 ^c $\pm$ 0.577 (17.24)
0.5M	146 ^a $\pm$ 0.00 (-9.88)	4.95 ^b $\pm$ 0.012 (4.65)	1.15 ^b $\pm$ 0.019 (8.49)	23.3 ^b $\pm$ 0.24 (4.48)	1.771 ^c $\pm$ 0.001 (7.93)	0.375 ^b $\pm$ 0.006 (17.92)	21.2 ^b $\pm$ 0.35 (9.28)	93.0 ^b $\pm$ 1.00 (12.45)	654 ^c $\pm$ 13.8 (13.15)	92.3 ^b $\pm$ 1.527 (8.97)

Means with different superscripts are significantly different from each other for various treatments (as indicated by Tukeys HSD) / Les moyennes avec différents exposants sont significativement différentes les unes des autres pour les divers traitements (comme l'indique l'HSD de Tukeys). Values in parenthesis indicate per cent change over control / Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de changement par rapport au témoin.

Table IV. Other costs of rearing for 100 DFLs.

Tableau IV. Coûts annexes d'élevage de 100 pontes saines.

Sl.No.	Rearing appliances	Amount
<i>No de série</i>	<i>Equipements d'élevage</i>	<i>Montant (Rs.)</i>
1.	Cost of disease free layings <i>Coût des pontes saines</i>	Rs.300
2.	Cost of room disinfectants (Formalin, bleaching powder, etc.) <i>Coût des désinfectants des locaux</i> (Formaline, chlorure de chaux, etc..)	Rs. 250
3.	Cost of paraffin paper and foam rubber strips <i>Coût du papier de paraffine et des bandes de caoutchouc mousse</i>	Rs. 200
4.	Cost of chemical and bed disinfectants <i>Coût des produits chimiques et des désinfectants de litière</i>	Rs. 150
5.	Non-recurring expenditure of rearing equipments and mountages <i>Dépenses d'équipement d'élevage et d'encabanages non récurrentes</i>	Rs. 720
6.	Depreciation value on building <i>Amortissement des bâtiments</i>	Rs. 225
7.	Cost of transportation and marketing of cocoons <i>Coût du transport et de la commercialisation des cocons</i>	Rs. 100
8.	Labor cost of silkworm rearing @30 MD/100DFLs @Rs.100/MD <i>Coût de la main d'oeuvre pour l'élevage du ver à soie à raison de 30 jours de travail / 100 pontes saines et de 100 Rs. / jour de travail.</i>	Rs. 3000
Total		Rs. 4945

Shell ratio:

Shell ratio increased from 19.4 % in control to 21.5 % and 22.7 % in 0.01 and 0.1M cholesterol treated silkworms. The increase observed in shell ratio at 0.5M was not significantly different from that of 0.01M.

Pupation rate:

Pupation rate improved significantly from 82.7 % in control to 95.0 % and 98.0 % in 0.01 M and 0.1M cholesterol treated batches. The improvement in pupation rate in 0.5M and cholesterol concentrations was not significantly different from the other two cholesterol concentrations.

Table V. Economics of cocoon production of cholesterol treated larvae of *Bombyx mori* L.Tableau V. Rentabilité de la production de cocons à partir de larves de *Bombyx mori* L. traitées au cholestérol.

Treatments	Economics											
	Leaf consumption (g/larva)	Leaf consumption of 5 th instar for 100 DFLs (kg)	Leaf consumption of all instars for 100 DFL (kg)#	Price of leaf @Rs 7.5 / kg A	Cocoon weight (g)	Cocoon yield (kg / 100 DFLs) B	Cost of chemical (Rs) C**	Cost of rearing (Rs) D	Total cost of rearing (Rs.) E= (A + C + D)	Gross Profit (Rs.) F = B@ Rs .250 *	Net profit (Rs.) G = F -E	B : C ratio
Evaluation économique												
Traitements	Consommation de feuilles de feuilles (g / larve)	Consommation de feuilles du 5 ^{ème} âge pour 100 pontes saines (kg)	de toutes les feuilles à raison des âges pour 100 pontes saines (kg)#	Prix de la feuille à raison de 7,5 Rs / kg A	Poids du cocon (g)	Rendement en cocons (kg / 100 pontes saines) B	Coût du produit chimique (Rs) C**	Coût de l'élevage (Rs) D	Coût total de l'élevage (Rs.) E = (A+ C + D)	Profit brut (Rs.) F = B@ Rs .250 *	Profit net (Rs.) G = F -E	Ratio B : C
Control / Témoin	8.73	419.04	523.8	3929	1.64	78.72	-	4945	8874	19,680	10,806	1.22:1
0.01M	7.47	358.56	462.0	3465	1.77	84.96	30	4945	8440	21,240	12,800	1.51:1
0.1M	7.16	343.68	447.0	3352	1.73	83.04	300	4945	8467	20,760	12,163	1.42:1
0.5M	6.60	316.80	420.0	3150	1.72	84.96	1500	4945	9595	21,240	11,645	1.21:1

Leaf consumption @ 0.33, 1.00, 5.00, 13.67 and 80.00% for 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th instar respectively. / Consommation de feuilles à raison de 0,33 ; 1,00 ; 5,00 ; 13,67 et 80 % pour respectivement le 1^{er}, le 2^{ème}, le 3^{ème}, le 4^{ème} et le 5^{ème} âge.

* Price of cocoon @ Rs.250/kg / Prix du cocon à raison de 250 Rs / kg.

** Cost of chemical @ Rs.10/g. / Coût du produit chimique à raison de 10 Rs. / g.

Fecundity:

Fecundity, which is the number of eggs laid per moth, was 578 in control. A significant increase in fecundity was observed in 0.1M (695) followed by 0.5M (654) and 0.01M (625) cholesterol treatments.

Hatching percentage:

The hatching percentage was 84.7 in control. The hatching percentage improved significantly to 96.0 and 99.3 in 0.01 and 0.1M cholesterol treated silkworms but the hatching percentage at 0.5M was 92.3.

Economics of rearing:

Cholesterol treatment reduces the total cost of rearing by savings on leaf consumption which are 62, 76 and 103 kgs at 0.01, 0.1 and 0.5M cholesterol concentrations respectively and increase in the gross profit by rupees 1560, 1080 and 1560 at 0.01, 0.1 and 0.5M cholesterol concentration (Table V). The net profits were rupees 12,800, 12,163, 11,645 and B:C ratios were 1.55, 1.42 and 1.21 at 0.01, 0.1 and 0.5M cholesterol concentrations respectively.

DISCUSSION

The role of dietary sterols in nutrition and physiology of phytophagous insects like *B. mori* has been well documented (Ito *et al.*, 1964; Hamamura, 1970; Thompson, 1985; Bernay, 1992). The inability of the insect to synthesize sterols generates sterol auxotrophy, impairing insect growth and development on sterol deficient diets. Insects possess remarkable ability to convert dietary sterols to cholesterol. The nutritional value of the sterol in the host plant depends on the ability of the insect to convert it to cholesterol. The feeding behavior in insects is therefore guided by the predominant sterol in the host plant. Hamamura, *et al.* (1962) reported that sitosterol stimulated feeding response in *B. mori*. Also, sitosterol elicited better biting response than cholesterol and ergosterol in *B. mori* (Hamamura, 1970).

A dose dependent decrease during the active growth phase suggests reducing feeding response when cholesterol supplemented mulberry leaf was provided for ingestion. Phytophagous insects do not selectively absorb when a mixture of sterols was provided for ingestion (Behmer, 1999). Sterol absorption takes place across midgut tissue in phytophagous insects (Joshi and Agarwal, 1977; Jouni *et al.*, 2002). Insects do not have bile salts that play a significant role in sterol absorption in vertebrates (Behmer and Ness, 2003). The sterols are packaged as mixed micelle with phospholipids and are absorbed into the midgut epithelial cells in insects (Turunen and Chippendale, 1977). Dietary lipids enhance the efficiency of sterol uptake in the grass moth, *Crambus tricestus* (Dupnik and Kamm, 1970). Ito and Nakasone (1966) demonstrated soybean fatty acids increased utilization of sitosterols in *B. mori*.

The reduced food intake might be due to increased coabsorption of fatty acids in the leaf diet. Enzymatic etherification of hydroxyl group of sterol with dietary fatty acids facilitates sterol uptake by mid gut tissue. But, the acute drop in the amounts of ingested leaf on days 5 and 6 in contrast to the uniform decrease observed on the preceding days of larval development, suggests ecdysteroid synthesis by utilizing the cholesterol supplemented through the leaf diet. A temporal change in the ecdysteroidogenic activity of the prothoracic glands was observed during 4th larval instar of *B. mori* (Gu *et al.*, 2000). Prothoracic glands become active two days before the end of the 5th instar in *B. mori*. The increase in ecdysteroid titers suppresses corpora allata activity and the consequent fall in haemolymph juvenile hormone activity brings down food intake in preparation for moulting and metamorphosis (Lazarovici *et al.*, 2005). Increasing dietary concentrations of cholesterol resulted in several fold increase in the cholesterol content of the tissues like fat body, nerve tissues, salivary glands, malpighian tubules and reproductive organs (Lasser *et al.*, 1966).

The three basic parameters that influence larval growth are the amounts of leaf consumed, excreta formed and the proportion of the food incorporated as body substance. The amount of the leaf digested depends on its nutritive value and the ability of the silkworm to digest and absorb the leaf nutrients. The differences in the amounts of leaf digested could be attributed to cholesterol since homogeneity of leaf quality and silkworm is maintained in the present experiment. The silkworms used were from the same genetic stock and similar developmental stage.

The nutritive value of the leaf increases by cholesterol supplementation leading to lower levels of its ingestion and digestion. The relatively higher decrease of leaf ingested on 5th and 6th day is an account of the cumulative effect of absorbing higher levels of carbon resources during the preceding days of larval development. The relatively higher decrease observed at higher doses brought greater reduction in the quantity of leaf ingested on 5th and 6th day. ECI increases significantly during active growth stage in control. ECI showed a higher increase in larvae fed up on cholesterol-supplemented leaf. The increase in ECI was higher at higher doses of cholesterol. ECI reflects the ability of the silkworm to utilize ingested leaf for weight gain. Higher ECI is observed when greater proportion of ingested food is incorporated into body substance and lesser metabolic energy is utilized to convert leaf substance into the body constituents of the silkworm. Cholesterol association brought about easy conversion of the leaf constituents into silkworm body substance at a reduced metabolic cost.

ECD values were higher during active growth and cholesterol supplementation increased further ECD values in silkworms. Also, relatively higher values of ECD were observed at higher levels of cholesterol application. ECD depends on the levels of the food intake and its nutritive value. ECD depends less on the digestibility of the nutritive food but more on the metabolic cost of growth and maintenance. Higher ECD values suggest higher food efficiency and lower cost of maintenance. Approximate digestibility is the proportion of the ingested food digested and absorbed. Approximate digestibility depends on a number of factors like rate and quantity of food intake, retention time in the midgut, nature and efficiency of digestive enzymes and digestibility of the complex nutritive components in the diet. The approximate digestibility is relatively high on day 1 due to gut emptiness during preceding moulting stage and lower rates of consumption. The approximate digestibility falls significantly on 2nd day due to increased food intake and faster gut movement leading to lesser retention time. Approximate digestibility improves significantly during active growth period (days 3-6) despite higher levels of consumption by increased efficiency of digestive enzymes, which are induced to greater secretion by secretagogue mechanism (Chapmann, 1998). The approximate digestibility decreased consistently in silkworm fed upon cholesterol-supplemented leaf. Approximate digestibility is not a reliable estimate as metabolic wastes like uric acid are added to the undigested food and are not taken into account (Waldbauer, 1968).

Consumption index increases significantly till mid-growth period after which it falls consistently to reach minimal levels on 6th day of larval development. Consumption indices were lower in silkworm consuming cholesterol supplemented leaves, which means less leaf is required to produce a unit gain in the larval weight. Cholesterol supplementation presumably improves the nutritive value of leaf by its own absorption and increase in the absorption of essential leaf nutrients. The growth rate increases consistently in control from day 1 to attain maximum level on 4th day after which it drops successively to attain minimal level on 6th day. The growth rate in cholesterol treated silkworm followed the same pattern though the values tend to be higher than the control. The higher growth rate despite lower consumption could be attributed to lower levels of coefficient of metabolism observed in silkworms fed with cholesterol treated leaf. Lower coefficients of metabolism observed in silkworm fed with cholesterol treated leaf result from lower energy cost for maintenance and growth. Significantly higher levels of COM in control and treated silkworms on day 6 reflect the metabolic casts of silk synthesis.

A number of economic characters that provide estimates of silkworm growth, silk biosynthesis, silk and egg production are determined in treated larvae to evaluate the impact of cholesterol treatment on them. Larval duration was significantly reduced in all the treatments though the difference between

the treatments was not significant. Both feeding duration and maturation period were reduced on cholesterol treatment. The reduction in feeding duration is caused by increased feed conversion efficiency due to higher titers of metabolic hormones in the circulating haemolymph (Gu *et al.*, 2000; Sashindran Nair *et al.*, 2004). Higher basal levels of ecdysteroids increased the secretory activity of corpora allata (Gu and Chow, 1996). Maturation time was reduced on account of precursor role of cholesterol for ecdysteroid synthesis. Higher percentages of pupation observed in cholesterol treated larvae supports synchronization of spinning activity by significant reduction in maturation time. Phytosterols from diverse resources have been used to synchronize spinning activity in commercial silkworm rearing (Trivedy *et al.*, 2003a; Trivedy *et al.*, 2003b; Nirmal Kumar *et al.*, 2006). Better feed conversion efficiency results in 5-9 % increase in larval weight despite lower consumption index (Table III). The difference in the larval weight between treatments did not significant impact on silk biosynthesis as evident from higher silk gland weights and higher silk gland somatic indices at 0.01 and 0.1M cholesterol concentrations. The role of ecdysteroids in silk biosynthesis has been well established (Trivedy *et al.*, 2003a, Trivedy *et al.*, 2003b; Nirmal Kumar *et al.*, 2006). Application of exogenous sterol compounds from plant sources through last feeding hastens maturation process by increasing the synthesis and secretion of silk in silk gland. Higher shell weight and shell ratio at 0.01 and 0.1M cholesterol concentration corroborate steroid stimulated silk synthesis and secretion.

Cholesterol provides indirect support to silk biosynthesis in its precursor role towards ecdysteroid synthesis but is directly involved in egg development. Cholesterol is a dominant sterol that accumulates in eggs (Dutky *et al.*, 1963; Ba *et al.*, 1995; Jouni *et al.*, 2002). Cholesterol is esterified and stored in higher quantities in diapause eggs than in non-diapause eggs (Ichimasa, 1976). Cholesterol free diets do not significantly affect egg production in adult female *Locusta migratoria* (Costet *et al.*, 1987) but embryonic development and hatching are severely altered by low ecdysteroid levels. Also, in the diamondback moth, *P. xylostella*, dietary sterols affected egg viability but not total egg production (Behmer and Grebenok., 1998). Though cholesterol free diets may not affect egg production in lepidopteron insects, cholesterol supplemented diet has significantly improved the fecundity from 578 in control to 625 at 0.01M and 695 at 0.1M cholesterol concentrations in *Bombyx mori*. The hatching percentage has improved from 84.7 to 96.0 at 0.01M and 99.3 at 0.1M cholesterol treatments. Cholesterol is essential for normal embryonic development through its support for ecdysteroid synthesis and its involvement in the formation of new membranes in association with phospholipids.

Economics of rearing:

The economics of silkworm rearing after 5th instar larvae were given three treatments of three doses of cholesterol showed a net increase in profit of Rs. 1,994, 1,357, 839 at 0.01, 0.1 and 0.5M cholesterol concentration respectively. Gross profit is calculated by utilizing a flat rate of Rs. 250/kg of cocoon notwithstanding higher cocoon price the cholesterol treated larvae might get an account of higher cocoon weight and better silk content of cocoon. The net profit could increase by restricting the applications to the time when greater reduction in consumption was observed (like 5th day) and extending the cholesterol applications to penultimate larval stage. Further, large amounts of savings on leaf of 60.48, 75.36, 102 kg for 100 DFLs during 5th instar will be of great advantage at times of silkworm rearing during summer season in tropical climates when recurrent leaf shortages are often encountered.

REFERENCES

- BA A., GUO D., NORTON R.A., PHILLIPS S.A., NES W.D. (1995) Developmental differences in the sterol composition of *Solenopsis invicta*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 29, 1-9.
 BEHMER S.T., ELIAS D.O. (1999) Phytosterol structure and its impact on feeding behavior in the generalist grasshopper *Schistocerca americana*. Physiol. Entomol., 24, 18-27.

- BEHMER S.T., GREBENOK R.J. (1998) Impact of sterols on life-history traits of a caterpillar. *Physiol. Entomol.*, 23, 165-175.
- BEHMER S.T., NES W.D. (2003) Insect Sterol Nutrition and Physiology: A Global Overview. *Advances in Insect Physiology.*, 31, 1-72.
- BERNAYS E.A. (1992) Plant sterols and host-plant affiliations of herbivores. In: *Insect plant interactions* (ed. Bernays, E.A.), Vol.4, pp. 45-57. Boca Raton, FL: CRC press
- CHAPMANN R.F. (1998) *The insects: Structure and Function*, 4th Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, United Kingdom.
- CLAYTON R.B. (1964) The utilization of sterols by insects. *Journal of Lipid Research.*, 5, 3-19.
- COSTET M.F., ACHOURI M.E., CHARLET M., LANOT R., BENVENISTE P., HOFFMANN J.A. (1987) Ecdysteroid biosynthesis and embryonic development are distributed in insects (*Locusta migratoria*) reared on plant diet (*Triticum sativum*) with a selectively modified sterol profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84, 643-647.
- DAI J.D., MIZOGUCHI A., SATAKE S., ISHIZAKI H., GILBERT L.I. (1995) Developmental changes in the prothoracicotropic hormone content of the *Bombyx mori* brain-retocerebral complex and haemolymph: Analysis by immunogold electron microscopy, quantitative image analysis, and time-resolved fluoroimmunoassay. *Devl. Biol.*, 171, 212-213.
- DANDIN S.B., JAYANT JAYASWAL, GIRIDHAR K. (2003) *Handbook of Sericulture Technologies*. Central Silk Board, Bangalore, p 287.
- DUPNIK T.D., KAMM J.A. (1970) Development of an artificial diet for *Crambus trisectus*. *J. Econ. Entomol.*, 63, 1578-1581.
- DUTKY R.C., ROBBINS W.E., KAPLANIS J.N., SHORTINO, T.J. (1963) The sterol esters of housefly eggs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 9, 251-255.
- GILBERT L.I., RYBCZNIKI R., WARREN J.T. (2002) Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Rev. Ent.*, 47, 883-916.
- GU S.H., TSIA W.H., CHOW Y.H. (2000) Temporal analysis of ecdysteroidogenic activity of the prothoracic glands during the fourth larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.*, 30, 499-505.
- GU S.H., CHOW, Y.S. (1996) Regulation of juvenile hormone biosynthesis by ecdysteroid levels during the early stages of the last two larval instars of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 42, 625-632.
- HAMAMURA Y. (1970) The substances that control the feeding behavior and the growth of the silkworm, *Bombyx mori* L. In: *Control of Insect Behavior by Natural products* (eds. Wood, D.L., Silverstein, R.M., and Nakajima, M.), pp. 55-80. London Academic Press.
- HAMAMURA Y., HAYASHIYA K., NAITO K., MATSUURA K., NISHIDA J. (1962) Food selection by silkworm larvae. *Nature.*, 194, 754-755.
- ICHIMASA Y. (1976) Sterol accumulation in developing ovaries of the silkworm *Bombyx mori* in relation to the diapause hormone. *J. Insect Physiol.*, 22, 1071-1074.
- ICHIMASA Y. (1976) Sterol accumulation in developing ovaries of the silkworm *Bombyx mori* in relation to the diapause hormone. *J. Insect. Physiol.*, 22, 1071-1074.
- IKEKAWA N., MORISAKI M., FUJIMOTO Y. (1993) Sterol metabolism in insects: Dealkylation of phytosterol to cholesterol. *Acc. Chem. Res.*, 26, 139-146.
- ITO T., ARAI N. (1967) Nutritive effects of alanine, cystine and glycine, serine, and tyrosine on the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology.*, 13, 1813.
- ITO T., KAWASHIMA K., NAKAHARA M., NAKANISHI K., TERAHARA A. (1964) Effects of sterol on feeding and nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect hysiol.*, 10, 225-238.
- ITO T., NAKASONE S. (1966) Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori*, XIII. Nutritive effect of fatty acids. *Bull. Sericult. Exp., Station Tokyo Japan.* 21, 385-400.
- JOSHI M., AGARWAL H.C. (1977) Site of cholesterol absorption in some insects. *J. Insect Physiol.*, JOUNI Z.E., YUN H.K., WELLS M.A. (2002) Absorption and tissue distribution of cholesterol in *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 49, 167-175.
- LASSER N.L., EDWARDS A.M., CLAYTON R.B. (1966) Distribution and dynamic state of sterols and steroids in the tissues of an insect, the roach *Eurycotis floridana*. *J. Lipid. Res.*, 7, 403-411.

- LAZAROVICI P.D., SHAPIRA D., PISAREV V., SHAAYA E. (2005) Ecdysteroid level and the change in sensitivity to a juvenile hormone analogue in *Ephestia cautella* larvae (Lepdostera, Phycitidae) Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 1(4), 409-415.
- NIRMAL KUMAR S., SHASHINDRAN NAIR K., JAGAT RABHA (2006) Role of phytoecdysteroid treatment time in the maturation process of Multi×Bivoltine (BL67×CSR101) hybrid silkworm, *Bombyx mori* L. when maintained at low, medium and high temperatures. Int. J. Indust. Entomol., 12, 51-56.
- SEHNAL F. (1989) Hormonal role of ecdysteroids in insect larvae and during metamorphosis. In: Koolman, J. (Ed.) Ecdysone: from Chemistry to Mode of Action. Thieme Medical publishers, New York, pp. 271-278.
- SHASHINDRAN NAIR K., JULA NAIR S., KANIKA TRIVEDY, VIJAYAN V.A., NIRMAL KUMAR S. (2004) Efficiency of feed conversion of the last instar silkworm, *Bombyx mori* L. under the influence of a Juvenoid, R394. Indian J. Seric., 43, 187-193.
- SHINJI N., OMORI Y., NAGASAWA H. (2006) Dietary sterol preference in the silkworm, *Bombyx mori*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 3094-3098.
- SHORT J. A., GUO D.A., SVOBODA J.A., NES W.D. (1996) Mechanistic and metabolic studies of sterol 24,25-double reduction in *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 31,1-22.
- SMITH S.L. (1985) Regulation of ecdysteroid titer: Synthesis. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I.(Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol.8. Pergamon, Oxford, pp. 295-341.
- SVOBODA J.A., THOMPSON M.J. (1985) Steroids. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 4, (ed. By G.A. Kerkut and L.I. Gilbert), pp.137-175. Pergamon press, Elmsford, NY.
- SVOBODA J.A., THOMPSON M.J. (1985) Steroids. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 4, (ed. By G.A. Kerkut and L.I. Gilbert), pp.137-175. Pergamon press, Elmsford, NY.
- THOMPSON M.J., KAPLANIS J.N., ROBBINS W.E., SVOBODA J.A. (1984) Metabolism of steroid in insects, Adv. Lipid Res., 11, 219-265.
- TRIVEDY K., NAIR K.S., RAMESH M., GOPAL N., NIRMAL KUMAR S. (2003b) Effect of phytoecdysteroid on maturation of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 43, 187-193.
- TRIVEDY K., NAIR K.S., RAMESH M., GOPAL N., NIRMAL KUMAR S. (2003a) Early and uniform maturation in silkworm, *Bombyx mori* L. by phytoecdysteroid extracted from a plant of family caryophyllaceae. Int. J. Indust. Entomol., 7, 65-68.
- TUKEY J.W. (1953) The problem of multiple comparison. Mimeographed for limited circulation (Reference from Shedecor, G.W., Statistical Methods. Iowa state college press, Ames).
- TURUNEN S., CHIPPENDALE G.M. (1977) Lipid absorption and transport: Sectional analysis of the larval mid gut of the corn borer, *Diatraea grandiosella*. Insect Biochem., 7, 203-208.
- WALDBAUER G.P. (1968) The consumption and utilization of food by insects. Advances in Insect Physiology., 5, 229-288.

EFFET D'UN SUPPLEMENT EN CHOLESTEROL AVEC UNE ALIMENTATION A BASE DE FEUILLES SUR LA NUTRITION ET LES CARACTERES ECONOMIQUES DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

FIRDOSE AHMAD MALIK & Y. SRINIVASA REDDY*

Department of Studies in Sericultural Science, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore – 570 006, Inde.

Nous avons étudié les paramètres nutritionnels et économiques chez le ver à soie nourri avec des feuilles fortifiées avec des doses de 0,01 ; 0,1 et 0,5 M de cholestérol le 1^{er}, le 3^{ème} et le 5^{ème} jour du 5^{ème} âge de développement larvaire. L'augmentation de l'absorption de cholestérol diminue les quantités de feuilles ingérées et digérées et augmente l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) et l'efficacité de conversion de la nourriture digérée (ECD). L'ECI et l'ECD augmentent chez le ver à soie grâce à l'efficacité de conversion de la nourriture, induite par le cholestérol. L'économie en matière d'activité alimentaire grâce à l'utilisation optimale des nutriments disponibles est évidente de par la réduction volontaire de la consommation de nourriture. Les taux de croissance augmentent malgré les niveaux d'ingestion et de digestion de feuilles plus bas, en raison de la baisse du coefficient de métabolisme. La co-absorption forcée de plus d'acides gras avec une alimentation à base de feuilles supplémentée en cholestérol baisse le coefficient de métabolisme grâce aux économies d'énergie nécessaire à leur synthèse. On observe une diminution significative de la durée larvaire par la diminution de la période de croissance et du temps de maturation, grâce à la synthèse de l'ecdystéroïde induite par le cholestérol. Une augmentation semblable de la productivité en cocons et du potentiel de reproduction observée avec le traitement au cholestérol suggère l'importance du cholestérol non seulement pour la croissance et le développement mais aussi pour la production de soie et d'œufs et pour le développement embryonnaire. On observe une augmentation significative de la fécondité et du pourcentage d'éclosion grâce au soutien des stéroïdes, qui permettent une production d'œufs et un développement embryonnaire viables.

INTRODUCTION

Les insectes ne peuvent pas synthétiser les stéroïdes essentiels au métabolisme des lipides et à la synthèse de l'ecdystéroïde (Clayton, 1964 ; Svoboda et Thompson, 1985). Le cholestérol est le stérol dominant des tissus même chez les insectes phytophages, bien que les plantes en contiennent rarement à des niveaux appréciables. Chez le ver à soie, le cholestérol endogène est produit par la modification des composants des feuilles de mûrier. Le sitostérol dans les feuilles de mûrier a une valeur nutritive élevée puisqu'il peut être converti en cholestérol par le mécanisme de 2,4-dealkylation, que l'on a rapporté être actif chez les larves de *Bombyx mori* (Ikekawa et coll., 1993 ; Short et coll., 1996). Les deux intermédiaires dans le processus de déalkylation du β -sitostérol, c'est-à-dire le fucostérol et le

* Auteur auquel adresser la correspondance : Prof. Y. Srinivasa Reddy, DOS in Sericultural Science, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore – 570 006, Fax : 0091821 – 2419335.

desmostérol sont très efficaces pour le maintien d'une bonne croissance larvaire (Ito et Arai, 1967). La croissance des larves est affaiblie par un régime déficient en stérol (Shinji et coll., 2006).

On peut largement attribuer l'effet de promotion de la croissance du cholestérol à l'ecdystéroïde synthétisée par les glandes prothoraciques. Les ecdystéroïdes jouent un rôle significatif dans la croissance et le développement de l'insecte y compris dans la mue et dans la métamorphose (Smith, 1985; Sehna, 1989 ; Gilbert et coll., 2002). Un niveau différentiel de base en ecdystéroïde est maintenu pendant la croissance larvaire (Sehna, 1989). Les niveaux relativement élevés d'ecdystéroïde pendant les premiers stades de l'avant-dernier âge larvaire stimulent les corpora allata, à des niveaux plus élevés de synthèse de l'hormone juvénile, essentielle à la croissance larvaire (Gu et Chow, 1996). On induit une métamorphose précoce, quand on diminue la production d'ecdystéroïde de manière artificielle, quand les corpora allata arrêtent de produire de l'hormone juvénile (Gu et coll., 2000).

Les ecdystéroïdes sont utiles pour maintenir un niveau élevé d'hormone juvénile pendant la période entre les mues et induire la mue et la métamorphose à la fin de la phase de croissance par des niveaux plus élevés dans l'hémolymphe. La capacité stéroïdogénique des glandes prothoraciques varie significativement pendant les différentes périodes de croissance de la larve à cause de sa sensibilité variable à l'hormone prothoracicotrope (PTTH) et à l'AMP cyclique (cAMP). Bien qu'il se produise des fluctuations des niveaux de PTTH dans l'hémolymphe pendant l'avant dernier et le dernier âge larvaire de *B. mori* (Gu et coll., 2000), les niveaux de PTTH existent toujours pendant la période de croissance larvaire (Dai et coll., 1995).

La compétence ecdystéroïdogénique de la PTTH *in vitro* varie significativement pendant les différentes périodes de croissance du ver à soie du 4^{ème} âge (Gu et coll., 2000). Les soi-disant phyto-ecdystéroïdes (Trivedy et coll., 2003a ; Trivedy et coll., 2003b ; Nirmal Kumar et coll., 2006) qui sont essentiellement des phytostérols ont été utilisés pour synchroniser l'activité de filage des larves pendant l'élevage en masse du ver à soie du mûrier. Le moment d'application des phytostérols pour une activité de filage stéroïdogénique synchronisée est important, compte tenu d'une variabilité significative de la compétence stéroïdogénique des glandes prothoraciques pendant les différentes périodes de la croissance larvaire.

Le cholestérol est un stérol dominant qui s'accumule dans les œufs, quel que soit les composants en stérol alimentaire (Ba et coll., 1995 ; Behmer et coll., 1999). Ichimasa (1976) a constaté que chez le ver à soie, l'accumulation d'esters de stérol est plus élevée chez les ovaires en diapause que chez ceux qui ne sont pas en diapause. Le cholestérol est transporté du corps gras vers les œufs par la lipophorine selon un mode d'action de diffusion aqueux dépendant de la température (Jouni et coll., 2002 ; Yen et coll., 2002). 90 % de la diminution des titres en cholestérol de l'hémolymphe par une intervention alimentaire apporte environ 10 à 20 % de baisse de la production d'œufs chez la femelle adulte de *Locusta migratoria* (Costet et coll., 1987). La teneur en ecdystéroïde dans les œufs pondus varie et on observe des anomalies sévères du développement (Behmer et Ness, 2003). Compte tenu de l'importance des ecdystéroïdes dans la croissance larvaire et le développement embryonnaire, nous avons étudié les effets du cholestérol exogène sur un certain nombre de paramètres nutritifs et de caractères économiques chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

Elevage du ver à soie :

On a utilisé dans cette recherche MGM851, une race de ver à soie bivoltine, venant d'être mise au point. On lève quatre pontes saines (DFL) de la race et on les élève d'après la technique d'élevage standard de Dandin et coll., (2003). On utilise des feuilles fraîches de mûrier de la variété V1 pour nourrir les larves. On regroupe les larves du 5^{ème} âge venant de muer en quatre lots, chaque lot ayant trois répétitions de 50 larves, et on les élève à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $70 \pm 5\%$ d'HR.

Traitement au cholestérol :

On dissout le cholestérol (obtenu auprès des Laboratoires Sisco Research, Mumbai, Inde) dans une petite quantité de chloroforme et on le dilue avec de l'éthyle d'alcool à des concentrations de 0,01 ; 0,1 et 0,5M. On enduit l'intérieur de la feuille de mûrier avec 1 ml de solution et après qu'elle ait séché, on en nourrit les larves du 5^{ème} âge. On donne d'abord la feuille enduite de cholestérol le jour du traitement et après que le groupe de 50 larves ait terminé les feuilles, on leur fournit de la feuille non traitée *ad libitum*. Les larves du lot I sont considérées comme témoin support puisque les larves sont nourries avec de la feuille de mûrier normale, vaporisée avec des aliquotes d'alcool éthylique. On nourrit les trois autres lots contenant 50 larves chacun (en trois répétitions) avec les trois doses de cholestérol sur les feuilles uniformément enduites le 1^{er}, le 3^{ème} et le 5^{ème} jour. On fournit de la feuille supplémentée en cholestérol pendant le 1^{er} repas le jour du traitement. On donne en tout trois repas chaque jour.

Indices nutritionnels :

On coupe des feuilles de mûrier fraîches en deux moitiés symétriques à partir de la nervure médiane, une moitié est utilisée pour mesurer la teneur en eau de la feuille (Delti et Pandian, 1972) et on pèse l'autre moitié et on l'enduit avec un volume connu de cholestérol. On offre une quantité égale et connue de feuilles à tous les lots de vers à soie, en prenant en considération les niveaux de consommation chaque jour pendant le 5^{ème} âge de développement larvaire. On sèche les feuilles qui restent et les excréments dans un four à air chaud à 80° C jusqu'à ce qu'on enregistre le poids constant et les valeurs. On enregistre les poids humide et sec initial et final des larves chaque jour. On enregistre la consommation et l'utilisation quotidienne de nourriture en suivant la méthode gravimétrique standard (Waldbauer, 1968). On calcule les poids secs de la feuille ingérée et digérée par chaque larve et les indices nutritionnels tels que la digestibilité approximative (AD), l'efficacité de conversion de la feuille ingérée (ECI) et de la feuille digérée (ECD) en substance corporelle larvaire, l'indice de consommation (CI), le taux de croissance (GR) et le coefficient de métabolisme (COM) d'après la formule empirique de Waldbauer (1968).

Feuille ingérée :

La feuille ingérée est la quantité de feuille consommée par la larve, exprimée sur une période de 24 h.

Feuille ingérée = Poids sec de la feuille apportée – poids sec de la feuille restante

Feuille digérée :

La feuille digérée est la quantité de feuille assimilée par la larve pendant une période de 24 h.

Feuille digérée = Poids sec de la feuille ingérée – poids sec des excréments

Efficacité de conversion de la nourriture ingérée (ECI) :

L'efficacité de conversion de la nourriture ingérée en substance corporelle (ECI) est le pourcentage de nourriture digérée contribuant au gain de poids de la larve

$$ECI = \frac{\text{Poids sec pris par la larve}}{\text{Poids sec de la nourriture ingérée}} \times 100$$

Efficacité de conversion de la nourriture digérée (ECD) :

L'efficacité avec laquelle la nourriture digérée est convertie en substance corporelle (ECD) est le pourcentage de nourriture digérée contribuant à la prise de poids de la larve

$$ECD = \frac{\text{Poids sec pris par la larve}}{\text{Poids sec de la nourriture digérée}} \times 100$$

Digestibilité approximative (AD) :

La digestibilité approximative est le pourcentage de nourriture ingérée soumise à la digestion et à l'absorption dans l'intestin moyen.

$$AD = \frac{\text{Poids de la nourriture digérée}}{\text{Poids de la nourriture ingérée}} \times 100$$

Indice de consommation (CI) :

L'indice de consommation est la quantité de nourriture consommée pour une augmentation d'une unité du poids moyen de la larve.

$$CI = \frac{\text{Poids sec de la nourriture consommée}}{\text{Durée de la période d'alimentation} \times \text{poids sec moyen de la larve pendant la période d'alimentation}}$$

Taux de croissance (GR) :

Le taux de croissance est le gain de poids quotidien pendant la période de croissance larvaire.

$$GR = \frac{\text{Gain de poids sec de la larve pendant la période d'alimentation}}{\text{Durée de la période d'alimentation} \times \text{poids sec moyen de la larve pendant la période d'alimentation}}$$

Coefficient de métabolisme (COM) :

Le coefficient de métabolisme est la part de nourriture digérée nécessaire à l'activité métabolique produisant le gain de poids manifesté.

$$COM = \frac{\text{Poids de la nourriture digérée} - \text{augmentation du poids de la larve}}{\text{Poids de la nourriture digérée}}$$

On utilise les cocons récoltés pour calculer le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse, ainsi que la fécondité et le pourcentage d'éclosion.

Rendement en cocons :

On calcule le rendement en cocons en utilisant la formule :

$$\text{Rendement en cocons (kg / 100 pontes saines)} = \frac{\text{CYR} \times \text{EH} / 100 \times 40\,000}{\text{NLR}} \times 100$$

où

CYR = Rendement en cocons par répétition

EH = Pourcentage d'éclosion des œufs

NLR = Nbre de larves par répétition

Indice somatique de la glande séricigène :

L'indice somatique de la glande séricigène est le poids de la glande séricigène exprimé en tant que pourcentage de poids larvaire. La quantité de soie synthétisée et accumulée dans la lumière de la glande séricigène contribue largement au poids de la glande séricigène chez les larves du 5^{ème} âge.

$$\text{Indice somatique de la glande séricigène} = \frac{\text{Poids de la glande séricigène (g)}}{\text{Poids de la larve mûre (g)}} \times 100$$

Évaluation économique de l'élevage du ver à soie :

On procède à l'évaluation économique de l'élevage avec l'utilisation de concentrations de 0,01 ; 0,1 et 0,5 M de cholestérol les 1^{er}, 3^{ème} et 5^{ème} jours chez les larves du 5^{ème} âge, en prenant en

considération la consommation de feuilles, le coût du produit chimique et les autres coûts d'élevage. Le coût total d'élevage de 100 pontes saines comprend les coûts annexes (Tableau IV) et les coûts de la feuille et du produit chimique. On utilise le coût actuel de la feuille de 7,5 Rs. / kg de poids sec de la feuille, le prix du cocon de 250 Rs. / kg et le coût du produit chimique de 1000 Rs. / 100 g pour le calcul. On utilise les poids secs de la feuille pour calculer la consommation totale et le coût de la feuille. En considérant que le niveau de consommation pendant le 5^{ème} âge est de 80 % (Dandin et coll., 2003), on ajoute un facteur correcteur de 104 kg, qui est équivalent à 20 % de 419 kg de poids de feuilles sèches consommées par les larves non traitées, aux valeurs de feuilles consommées pendant le 5^{ème} âge avec les trois traitements pour obtenir les valeurs de consommation totale de feuilles pendant tous les âges (Tableau III).

Analyses statistiques :

On utilise l'analyse de variance pour tester la signification des différences de moyennes des taux et des efficacités d'utilisation de nourriture et les caractères économiques du ver à soie nourri avec des feuilles traitées avec du cholestérol. On utilise les tests de comparaison multiple de Tukeys (1953) pour trouver la signification des différences entre les traitements. On considère les différences significatives à $P < 0,05$.

RESULTATS

On calcule les paramètres nutritionnels suivants après avoir nourri les vers à soie du 5^{ème} âge, le 1^{er}, le 3^{ème} et le 5^{ème} jour avec de la feuille complétée avec 0,01 ; 0,1 et 0,5 M de cholestérol (Tableaux I-II).

Feuille ingérée :

Les quantités de feuilles ingérées augmentent significativement du 1^{er} au 6^{ème} jour chez les larves non traitées (témoin). Les quantités de feuilles ingérées sont moins importantes le 1^{er} et le 3^{ème} jour, quand on apporte de la feuille complétée en cholestérol, mais des baisses relativement plus grandes sont observées les jours suivants à savoir le 2^{ème} et le 4^{ème} jour (Tableau I). Les pourcentages de baisse observés de la quantité de feuilles ingérées, quand on apporte de la feuille complétée en cholestérol le 5^{ème} jour, c'est-à-dire 24,88 ; 28,23 et 34,93 à des concentrations de cholestérol de 0,01 ; 0,1 et de 0,5 M sont significativement plus élevées que les baisses observées les autres jours. Les quantités de feuilles ingérées sont plus faibles avec des doses plus élevées de cholestérol. Les baisses moyennes des quantités totales de feuilles ingérées sont de 14,66 ; 18,10 et de 24,40 avec des doses de cholestérol de respectivement 0,01 ; 0,1 et de 0,5M (Tableau II).

Feuilles digérées :

Le complément en cholestérol entraîne une plus grande baisse de la quantité de feuilles digérées que de feuilles ingérées. La baisse de la quantité de feuilles digérées est plus importante avec des doses plus élevées d'application de cholestérol et on l'observe non seulement pendant des jours où on apporte du cholestérol, mais aussi les jours suivants quand on n'apporte que de la feuille non traitée. Les pourcentages de baisse observés dans les quantités de feuilles digérées le 5^{ème} jour, c'est-à-dire 37,09 ; 40,04 et 48,34 avec des concentrations en cholestérol de 0,01 ; 0,1 et 0,5 M sont relativement plus élevés et très significatifs. Les baisses en pourcentage de la quantité totale de feuilles digérées sont de 21,05 ; 25,68 et 32,85 respectivement avec une concentration en cholestérol de 0,01 ; 0,1 et de 0,5 M (Tableau II).

ECI et ECD :

Les valeurs de l'ECI sont plus faibles que les valeurs ECD correspondantes. L'ECI et l'ECD augmentent significativement après le complément en cholestérol (Tableau I). L'augmentation des

valeurs ECI et ECD le 5^{ème} jour est relativement plus élevée que les autres jours. On observe aussi des valeurs ECI et ECD plus élevées avec une concentration plus élevée en cholestérol.

Digestibilité approximative :

La digestibilité approximative est très élevée le 1^{er} jour et baisse significativement le 2^{ème} jour. On observe une augmentation régulière de la digestibilité approximative du jour 3 au jour 6 chez le témoin. La digestibilité approximative est plus faible chez les lots traités au cholestérol et la baisse relative est plus importante le jour 5 que les autres jours.

Taux de croissance :

Chez le témoin, le taux de croissance des larves augmente régulièrement du jour 1 au jour 5 et baisse significativement le jour 6. Le taux de croissance est significativement plus élevé chez les lots traités au cholestérol. Les taux de croissance sont plus élevés à une concentration plus élevée de cholestérol.

Indice de consommation :

Chez le témoin, l'indice de consommation est faible le jour 1 et augmente significativement les jours 2 et 3 mais baisse les jours 4 à 6. Les indices de consommation des larves nourries avec de la feuille traitée avec du cholestérol sont plus faibles que chez le témoin correspondant. Les baisses des indices de consommation sont plus importantes avec des concentrations en cholestérol plus élevées. De même, les baisses observées le 5^{ème} jour chez les lots traités sont significativement plus élevées que pendant les autres jours de traitement.

Coefficient de métabolisme :

Chez le témoin, le coefficient de métabolisme est élevé du 1^{er} au 3^{ème} jour mais baisse le 4^{ème} et le 5^{ème} jour. Chez le témoin, on remarque une augmentation significative du coefficient de métabolisme le 6^{ème} jour. Les coefficients de métabolisme chez les larves traitées s'avèrent être plus faibles chez les vers à soie nourris avec de la feuille complétée en cholestérol. De même, les baisses des coefficients de métabolisme observés le 5^{ème} jour avec les trois concentrations de cholestérol sont significativement plus élevées que celles des autres jours.

Caractères économiques :

Les données sur les caractères économiques sélectionnés chez les vers à soie nourris avec des feuilles de mûrier traitées avec du cholestérol sont présentées dans le Tableau III.

Durée larvaire :

La durée larvaire baisse significativement de 162h chez le témoin à 146h, 150 h et 149 h, avec des concentrations en cholestérol de respectivement 0,5 ; 0,01 et 0,1 M.

Poids larvaire :

Le poids larvaire augmente significativement de 4,73 g chez le témoin à 5,16 g chez les vers à soie traités avec 0,01 M de cholestérol. Le poids larvaire tend à baisser avec une concentration de cholestérol plus élevée, bien que la différence de poids larvaire entre les traitements (0,1 et 0,5 M) ne soit pas significative sur le plan statistique.

Poids de la glande séricigène :

On observe une augmentation plus élevée du poids de la glande séricigène avec une concentration en cholestérol de 0,1 M (27,36 %) et de 0,01 M (18,87 %) qu'avec 0,5 M (8,49 %).

Indice somatique de la glande séricigène :

Chez le témoin, la glande séricigène, représente 22,3 % de la masse corporelle. L'indice somatique de la glande séricigène passe à 24,3 % et 27,1 % avec des concentrations de cholestérol de 0,01 et de 0,1 M mais seulement à 23,3 % avec une concentration de 0,5 M.

Poids du cocon :

Le poids du cocon augmente significativement de 1,637 g chez le témoin à 1,773 g chez les vers traités avec 0,01 M de cholestérol. Bien qu'on observe des augmentations plus importantes avec des concentrations plus élevées en cholestérol, la différence concernant le poids du cocon entre les lots traités ne s'avère pas significative sur le plan statistique.

Poids de la coque :

Le poids de la coque augmente de 0,318 g chez le témoin à 0,382 g et 0,393 g pour les concentrations de cholestérol de 0,01 et de 0,1 M, qui sont relativement plus élevés que le poids de la coque de 0,375 g observé à la concentration suivante la plus élevée (0,5 M).

Richesse soyeuse :

La richesse soyeuse augmente de 19,4 % chez le témoin à 21,5 % et 22,7 % chez les lots de vers à soie traités avec 0,01 et 0,1 M de cholestérol. L'augmentation observée de la richesse soyeuse avec 0,5 M n'est pas significativement différente de celle avec 0,01 M.

Taux de nymphose :

Le taux de nymphose s'améliore considérablement de 82,7 % chez le témoin à 95 % et 98 % chez les lots traités avec 0,01 et 0,1 M de cholestérol. L'amélioration du taux de nymphose avec des concentrations de cholestérol de 0,5 M n'est pas significativement différente des deux autres concentrations de cholestérol.

Fécondité :

La fécondité, qui est le nombre d'œufs pondus par papillon est de 578 chez le témoin. On observe une augmentation significative de la fécondité avec 0,1 M (695), suivie par des traitements au cholestérol à 0,5 M (654) et 0,01 M (625).

Pourcentage d'éclosion :

Le pourcentage d'éclosion est de 84,7 chez le témoin. Le pourcentage d'éclosion s'améliore significativement jusqu'à 96 et 99,3 chez les vers à soie traités respectivement avec 0,01 et 0,1 M de concentration en cholestérol, mais le pourcentage d'éclosion avec 0,5 M est de 92,3.

Évaluation économique de l'élevage :

Le traitement au cholestérol diminue le coût total de l'élevage grâce aux économies de feuilles consommées, qui sont de 62, 76 et 103 kg, avec des concentrations en cholestérol de respectivement 0,01 ; 0,1 et 0,5 M et l'augmentation du profit brut est de 1560, 1080 et 1560 roupies avec des concentrations en cholestérol de 0,01 ; 0,1 et 0,5 M (Tableau V). Les profits nets sont de 12,800 ; 12,163 ; 11,645 roupies et les ratios B : C sont de 1,55 ; 1,42 et de 1,21 avec des concentrations en cholestérol de respectivement 0,01 ; 0,1 et 0,5 M.

DISCUSSION

Il existe beaucoup de documents sur le rôle des stérols alimentaires dans la nutrition et dans la physiologie des insectes phytophages comme *B. mori* (Ito et coll., 1964 ; Hamamura, 1970 ; Thompson, 1985 ; Bernay, 1992). L'incapacité de l'insecte à synthétiser les stérols génère une

auxotrophie du stérol, ce qui détériore la croissance et le développement de l'insecte avec des régimes insuffisants en stérol. Les insectes possèdent une capacité remarquable à convertir les stérols alimentaires en cholestérol. La valeur nutritionnelle du stérol chez la plante hôte dépend de la capacité de l'insecte à la convertir en cholestérol. Le comportement alimentaire chez les insectes est donc guidé par le stérol prédominant chez la plante hôte. Hamamura et coll., (1962) ont rapporté que le sitostérol stimule la réponse alimentaire chez *B. mori*. De même, le sitostérol provoque une meilleure réponse de prise de nourriture que le cholestérol et l'ergostérol chez *B. mori* (Hamamura, 1970).

Une baisse dépendante de la dose pendant la phase de croissance active suggère une diminution de la réponse alimentaire, quand on apporte de la feuille de mûrier complétée en cholestérol pour l'ingestion. Quand on leur apporte un mélange de stérols à ingérer, les insectes phytophages n'absorbent pas de manière sélective (Behrmer, 1999). L'absorption de stérol a lieu dans les tissus de l'intestin moyen chez les insectes phytophages (Joshi et Agarwal, 1977 ; Jouni et coll., 2002). Les insectes n'ont pas de sels biliaires, qui jouent un rôle significatif dans l'absorption des stérols chez les vertébrés (Behrmer et Ness, 2003). Les stérols sont stockés comme micelle mélangé avec les phospholipides et sont absorbés dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen chez les insectes (Turunen et Chippendale, 1977). Les lipides alimentaires améliorent l'efficacité d'absorption du stérol chez le papillon, *Crambus tricestus* (Dupnik et Kamm, 1970). Ito et Nakasone (1966) ont prouvé que les acides gras du soja augmentent l'utilisation des sitostérols chez *B. mori*.

La diminution de la nourriture absorbée pourrait être due à l'augmentation de la co-absorption des acides gras avec l'alimentation à base de feuilles. L'augmentation de l'estérification enzymatique du groupe hydroxyl des stérols avec les acides gras alimentaires facilite l'absorption du stérol par les tissus de l'intestin moyen. Mais, la baisse aigue des quantités de feuilles ingérées les jours 5 et 6, par opposition à la baisse uniforme observée les jours précédents de développement larvaire, suggère une synthèse de l'ecdystéroïde en utilisant le cholestérol ajouté à l'alimentation à base de feuilles. On observe un changement temporel de l'activité ecdystéroïdogénique des glandes prothoraciques pendant le 4^{ème} âge larvaire chez *B. mori* (Gu et coll., 2000). Les glandes prothoraciques deviennent actives deux jours avant la fin du 5^{ème} âge chez *B. mori*. L'augmentation des titres de l'ecdystéroïde supprime l'activité des corpora allata et la baisse consécutive de l'activité de l'hormone juvénile diminue l'absorption de nourriture en préparation de la mue et de la métamorphose (Lazarovici et coll., 2005). L'augmentation des concentrations alimentaires en cholestérol entraîne une augmentation importante de la teneur en cholestérol dans les tissus comme le corps gras, les tissus nerveux, les glandes salivaires, les tubes de Malpighi et les organes reproducteurs (Lasser et coll., 1966).

Les trois paramètres de base qui influencent la croissance larvaire sont les quantités de feuilles consommées, les excréments qui se forment et la part de nourriture incorporée comme substance corporelle. La quantité de feuilles digérées dépend de leur valeur nutritive et de la capacité du ver à soie à digérer et à absorber les nutriments de la feuille. On pourrait attribuer les différences de quantité de feuilles digérées au cholestérol, puisque dans cette expérience l'homogénéité de la qualité de la feuille et du ver à soie est maintenue. Les vers à soie utilisés proviennent de la même souche génétique et ont le même stade de développement.

La valeur nutritive de la feuille augmente avec l'ajout de cholestérol, qui entraîne des niveaux d'ingestion et de digestion plus faibles. La baisse relativement plus importante de feuilles digérées le 5^{ème} et 6^{ème} jour témoigne de l'effet cumulatif de l'absorption de niveaux plus élevés de ressources en carbone pendant les jours précédents le développement larvaire. La baisse relativement plus importante observée avec des doses plus élevées amène une diminution plus importante de la quantité de feuilles ingérées le 5^{ème} et 6^{ème} jour. L'ECI augmente significativement pendant le stade de croissance active chez le témoin. L'ECI présente une augmentation plus importante chez les larves nourries sur des feuilles complétées en cholestérol. L'augmentation de l'ECI est plus importante avec des doses plus élevées de cholestérol. L'ECI reflète la capacité du ver à soie à utiliser la feuille ingérée pour gagner du poids. On observe une ECI plus élevée, quand une proportion plus importante de

nourriture ingérée est incorporée en substance corporelle et que moins d'énergie métabolique est utilisée pour convertir la substance foliaire en constituants corporels du ver à soie. L'association de cholestérol entraîne une conversion facile des constituants de la feuille en substance corporelle du ver à soie à un rythme métabolique réduit.

Les valeurs ECD sont plus élevées pendant la croissance active et l'ajout de cholestérol augmente à nouveau les valeurs ECD chez les vers à soie. De même, on observe des valeurs ECD relativement plus élevées avec des niveaux plus élevés d'application de cholestérol. L'ECD dépend des niveaux d'absorption de nourriture et de sa valeur nutritive. L'ECD dépend moins de la digestibilité de l'alimentation nutritive que de la dépense métabolique de croissance et de maintien. Les valeurs ECD plus élevées suggèrent une efficacité nutritive plus importante et une dépense plus faible de maintien. La digestibilité approximative est la part de nourriture ingérée digérée et absorbée. La digestibilité approximative dépend d'un certain nombre de facteurs comme le taux et la quantité de nourriture absorbée, le temps de rétention dans l'intestin moyen, la nature et l'efficacité des enzymes digestives et la digestibilité des composants nutritifs complexes dans l'alimentation. La digestibilité approximative est relativement élevée le 1^{er} jour car l'intestin est vide pendant le stade qui précède la mue et en raison de taux de consommation plus faibles. La digestibilité approximative chute significativement le 2^{ème} jour en raison de l'augmentation de l'absorption de nourriture et du mouvement plus rapide de l'intestin, qui débouche sur un temps de rétention moins long. La digestibilité approximative s'améliore significativement pendant la période de croissance active (jours 3 à 6), malgré des niveaux plus élevés de consommation par l'augmentation de l'efficacité des enzymes digestives, qui sont poussées à une plus grande sécrétion par le mécanisme secrétogogue (Chapmann, 1998). La digestibilité approximative baisse régulièrement chez le ver à soie nourri avec de la feuille complétée en cholestérol.

La digestibilité approximative n'est pas une estimation fiable puisque les déchets métaboliques comme l'acide urique sont ajoutés à la nourriture non digérée et ne sont pas pris en compte (Waldbauer, 1968).

L'indice de consommation augmente significativement jusqu'au milieu de la croissance, après lequel, il baisse régulièrement pour atteindre des niveaux minimaux le 6^{ème} jour de développement larvaire. Les indices de consommation sont plus faibles chez le ver à soie qui consomme des feuilles complétées en cholestérol, ce qui signifie qu'il faut moins de feuilles pour produire un gain d'une unité de poids larvaire. L'ajout de cholestérol améliore vraisemblablement la valeur nutritive de la feuille de par sa propre absorption et augmente l'absorption des nutriments essentiels de la feuille. Le taux de croissance augmente régulièrement chez le témoin du jour 1, pour atteindre le niveau maximum le 4^{ème} jour, après lequel il baisse progressivement pour atteindre son niveau minimum le 6^{ème} jour. Le taux de croissance chez le ver à soie traité au cholestérol suit le même schéma, bien que les valeurs tendent à être plus élevées que chez le témoin. Le taux de croissance plus élevé, malgré la consommation plus faible, pourrait être attribué aux niveaux plus faibles du coefficient de métabolisme observé chez les vers à soie nourris avec des feuilles traitées au cholestérol. Les coefficients de métabolisme plus faibles observés chez le ver à soie nourri avec de la feuille traitée au cholestérol proviennent de la dépense plus faible d'énergie pour le maintien et la croissance. Des niveaux significativement plus élevés de COM chez le témoin et les vers à soie traités le 6^{ème} jour reflètent les rythmes métaboliques de la synthèse de la soie.

On détermine un certain nombre de caractères économiques qui apportent des estimations sur la croissance du ver à soie, la biosynthèse de la soie, la production de soie et d'œufs chez les larves traitées pour évaluer quel est l'impact du traitement au cholestérol pour elles. La durée larvaire diminue significativement chez tous les traitements, bien que la différence entre les traitements ne soit pas significative. La durée d'alimentation et la période de maturation diminuent avec le traitement au cholestérol. La diminution de la durée d'alimentation est provoquée par l'augmentation de l'efficacité de conversion de la nourriture en raison des titres plus élevés d'hormones métaboliques dans l'hémolymphe circulante (Gu et coll., 2000 ; Sashindra Nair et coll., 2004). Les niveaux de base

plus élevés des ecdystéroïdes augmentent l'activité sécrétrice des corpora allata (Gu et Chow, 1996). Le temps de maturation diminue à cause du rôle précurseur du cholestérol pour la synthèse de l'ecdystéroïde. Les pourcentages plus élevés de nymphose observés chez les larves traitées au cholestérol confirment la synchronisation de l'activité de filage par la diminution significative du temps de maturation. On a utilisé les phytostérols provenant de sources diverses pour synchroniser l'activité de filage dans l'élevage commercial du ver à soie (Trivedy et coll., 2003a ; Trivedy et coll., 2003b ; Nirmal Kumar et coll., 2006). La meilleure efficacité de conversion entraîne une augmentation du poids larvaire de 5 à 9 %, malgré l'indice de consommation plus faible (Tableau III). La différence de poids larvaire entre les traitements n'a pas d'impact significatif sur la biosynthèse de la soie comme le prouvent les poids plus élevés de la glande séricigène et les indices somatiques plus élevés de la glande séricigène avec des concentrations en cholestérol de 0,01 et 0,1 M. Le rôle des ecdystéroïdes dans la biosynthèse de la soie a bien été établi (Trivedy et coll., 2003a ; Trivedy et coll., 2003b ; Nirmal Kumar et coll., 2006). L'application de composés de stérol exogènes provenant de sources végétales au cours du dernier repas accélère le processus de maturation, par l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion de soie dans la glande séricigène. Le poids de coque plus élevé et la richesse soyeuse à une concentration de 0,01 et de 0,1 M corroborent le fait que la synthèse et la sécrétion de la soie sont stimulées par le stéroïde.

Le cholestérol apporte un soutien indirect à la biosynthèse de la soie dans son rôle précurseur pour la synthèse de l'ecdystéroïde, mais est directement impliqué dans le développement de l'œuf. Le cholestérol est un stérol dominant qui s'accumule dans les œufs (Dutky et coll., 1963 ; Ba et coll., 1995 ; Jouni et coll., 2002). Le cholestérol est estérifié et stocké en quantités plus élevées chez les œufs en diapause que chez les œufs sans diapause (Ichimasa, 1976). Les régimes sans cholestérol n'affectent pas significativement la production d'œufs chez la femelle adulte *Locusta migratoria* (Costet et coll., 1987), mais le développement embryonnaire et l'éclosion sont très altérés par les faibles niveaux en ecdystéroïde. De même, chez la plutelle *P. xylostella*, les stérols alimentaires affectent la viabilité des œufs mais pas la totalité de la production d'œufs (Behmer et Grebenok, 1988). Bien que les régimes sans cholestérol n'affectent peut-être pas la production d'œufs chez les insectes lépidoptères, le régime avec un supplément en cholestérol améliore significativement la fécondité, de 578 chez le témoin, à 625 avec des concentrations de cholestérol de 0,01 M et à 695 avec 0,1 M chez *Bombyx mori*. Le pourcentage d'éclosion s'améliore de 84,7 à 96,0 avec 0,01 M de traitement au cholestérol et à 99,3 avec 0,1 M. Le cholestérol est essentiel pour le développement embryonnaire normal par son soutien de la synthèse de l'ecdystéroïde et son implication dans la formation de nouvelles membranes en association avec les phospholipides.

Rentabilité de l'élevage :

L'évaluation économique de l'élevage du ver à soie, après avoir procédé à trois traitements avec trois doses de cholestérol, montre une augmentation nette des profits de 1 994, 1357, 839 Rs., avec une concentration respectivement de 0,01 ; 0,1 et 0,5 M en cholestérol. Le profit brut est calculé en utilisant un taux fixe de 250 Rs. / kg de cocons, malgré le prix plus élevé du cocon, les larves traitées au cholestérol pourraient avoir un poids du cocon plus élevé et une meilleure teneur en soie. Le profit net pourrait augmenter, en restreignant les applications au moment où on observe la diminution la plus importante de la consommation (comme le 5^{ème} jour) et en procédant aux applications de cholestérol pendant l'avant-dernier stade larvaire. De plus, les quantités importantes de feuilles économisées de 60,48 ; 75,36 ; 102 kg pour 100 pontes saines pendant le 5^{ème} âge présenteraient de grands avantages lors de l'élevage du ver à soie pendant l'été dans les climats tropicaux, lorsqu'on rencontre souvent des pénuries de feuilles récurrentes.

ANTIVIRAL ACTION OF PHYTO EXTRACT AGAINST CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS AND ITS EFFECT ON TOTAL AND DIFFERENTIAL HEMOCYTE COUNT IN TASAR SILKWORM, *ANTHRAEA MYLITTA* D.

G. P. SINGH, S. B. ZEYA, VARUN KULSRESHTHA, N. G. OJHA & N. SURYANARAYANA

Silkworm Pathology Laboratory, Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi – 835 303, India

Silkworm diseases are major constraint in silk cocoon production. Among diseases in tasar silkworm, Anthraea mylitta D. virosis caused by Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (CPV) is highly contagious and more prevalent. The antiviral action of aqueous extract of different parts of Adhatoda zeylanica, known for their antiviral properties were tested against infection of Cytoplasmic Polyhedrosis Virus. The influence of extract of flower, the most effective part of this plant on hematological changes in silkworm larvae infected with Cytoplasmic Polyhedrosis Virus was also observed. 3.0% aqueous extract of flowers of A. zeylanica (T4 × C3) was found more effective, which reduced the mortality in larvae due to virus infection to the level of 23.77% than inoculated control (89.97%). It was observed that total hemocyte count increased in hemolymph up to 6th days post inoculation in phytoextract treated batches while in the inoculated control the increase was within 3 days, indicating the positive hemocyte mediated response in silkworm treated with phytoextract. After two days in the inoculated control, as the multiplication of CPV increased, defense capacity of the silkworm decreased. Similarly, differential hemocyte count was different from the inoculated control. The prohemocyte plasmatocytes and granulocytes were maximum in number whereas oenocytoids were minimum in number. The number of degenerated blood cells was increased in inoculated control up to 8th days post inoculation. It is thus observed that hemocytes involved in defense mechanism against CPV and phytoextract prevent the multiplication of virus by enhancing the hemocyte mediated defense response.

Keywords: Antiviral, phytoextract, hemocyte count, *Anthraea mylitta*.

INTRODUCTION

Tasar silkworm suffers with virosis, a virus disease caused by a Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (CPV) which cause 25-30% loss in cocoon crop (Sahay *et al*, 2000). In view of the high cost of the chemicals and antibiotics and their hazardous consequences, now a day's use of biodegradable materials like fresh plant extracts has been on the top priority for control of diseases in plants (Jesper and Ward, 1993) and animals (Kumar *et al*, 1999). Phytoextracts have been reported to control grasserie disease (caused by Nuclear Polyhedrosis Virus) in silkworm, *Bombyx mori* L. (Kumar *et al*, 1998; Manimegalai *et al*, 2000) and virosis (caused by CPV) in tasar silkworm, *A. mylitta* D. (Singh *et al*, 2004).

Insects shows defense response through cellular and humoral components (Dunn, 1986, Gupta, 1986). Humoral reactions involve slow synthesis of antibacterial and antiviral principles and require several hours for full expression. Cellular responses are direct interactions between circulatory

hemocytes and invading non self materials. The interaction is immediate and includes phagocytosis, nodulation and encapsulation (Gupta, 1986). In insects, several types of hemocytes are observed in the hemolymph (Gupta, 1979, Arnold, 1979, Jonesh, 1979, Russo *et al.*, 1993, Butt and Shields, 1996). Nittono (1960) and Saran *et al.* (2002) classified the blood cells in the silkworm, *B. mori* L. and *A. mylitta* into six types i. e., prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, imaginal spherulocytes and oenocytes. A variety of functions like mechanization and immobilization of invading organism by encapsulation and/or phagocytosis, wound repair, coagulation have been reported for hemocytes (Jonesh, 1964, 1970, Ratcliffe and Rowley, 1979, Ratcliffe, 1993, Pech *et al.*, 1995).

Information on effect of various pathogens have been reported in the insects (Horohove and Dunn, 1982, Lea, 1985, 1986), however, influence of phytoextracts on hematological defense in the insects infected with CPV is limited. In the present study, the influence of phytoextract of *Adhatoda zeylanica* (having antiviral properties) on the hemocyte mediated responses is reported through study of total and differential hemocyte count in the hemolymph in the tasar silkworm infected with CPV.

MATERIALS AND METHODS

Adhatoda zeylanica Medic. a medicinal plant belonging to family Acanthaceae known for their antibiotic properties (Singh *et al.*, 1999) and available locally was selected and procured to test their efficacy against virosis in tasar silkworm, *A. mylitta* D. and its influence on hematological defense. The identification of the plant was confirmed from Botanical Survey of India. Aqueous extracts of plant parts was prepared by grinding 50g of clean and washed fresh plant materials (leaf/stem/root/flower) in a little water, filtering through muslin cloth and making the volume 100 ml. The plant extracts so prepared were centrifuged at 3000 rpm for 15 min in Remi R 23 fixed angular rotar with 100 ml capacity of centrifuge tubes. Final volume was made upto 100 ml with distilled water to bring the concentration of the stock to 50%. The stocks were further diluted to desired concentration with distilled water before use.

Antheraea mylitta Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (AmCPV) inoculum:

Fresh Cytoplasmic Polyhedrosis Virus inoculum was prepared from diseased silkworm of *A. mylitta*. Completely whitened mid-gut 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 min. 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 polyhedral suspension in sterile distilled water was prepared to contain 1×10^5 polyhedra/ml.

Inoculation of Polyhedra Occlusion Bodies (POBs) of AmCPV and treatment of larvae with plants extracts:

Silkworm larvae of Daba eco-race were orally inoculated (by feeding food plant leaf smeared with polyhedra suspension) with 200 μ l of AmCPV polyhedra (1×10^5 polyhedra/ml) inoculum 24 hrs after 2nd moult. After 6 hrs of virus inoculation and once in 3rd, 4th and 5th instar, larvae were allowed to feed on *Terminalia tomentosa* (asan) leaves treated with 1.0, 2.0 and 3.0% aqueous extract of leaf, stem, root and flower of *A. zeylanica*. Three replications with 50 silkworm larvae were maintained for each treatment and concentration for observations on effect of phytoextracts on virus infection. For the observations on influence of extracts on hematological defense, a separate batch of silkworms was maintained on fresh leaves of food plant up to 4th moult. The larvae after 4th moult in three replications (50 larvae each) were orally inoculated with POBs of AmCPV (1×10^5) and following two feedings were given with the leaves treated separately with aqueous extract of leaf, stem, root and flower of *A. zeylanica*. Both treated and control batches were reared on leaf of its

primary food plant, *Terminalia tomentosa* (Asan) in two rearing seasons (July – August and September – October) in indoor under normal rearing conditions up to spinning.

Estimation of hemocytes count:

Every day total hemocyte counts (THC) estimation in the hemolymph of all treated and control batches was determined following the method described by Tauber and Yeager (1934, 1935) using hemocytometer. The THC per mm³ of hemolymph was estimated according to the formula suggested by Jones (1962). Every day from 0 to 8th day, 6 larvae were collected from each replication, the hemolymph from all the 6 larvae was collected into three eppendoff tubes (2 larval hemolymph/tube) on ice and stored at 4° C. A total of 6 tubes represented 3 replication collections. The differential hemocyte count (DHC) was estimated by counting different hemocytes from a hemocyte population of 200. Different hemocytes were identified based on the morphological features as described by Nittono (1960).

The observations were made on development of diseases symptoms of virosis and larval mortality, and THC and DHC counts. The dead larvae in different treatments during rearing were examined microscopically for presence of concerned pathogens. Data recorded for mortality due to concerned pathogen and THC were statistically analyzed using Completely Randomized Design (Snedecor and Cockron, 1971).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of plant extracts on virosis:

The observations with regard to mortality due to virosis in silkworm, after POBs of AmCPV (1×10^5) inoculation and treatment with aqueous extracts of *Adhatoda zeylanica* are depicted in Table I.

Results revealed that the larva mortality due to virus infection was highest in the larvae inoculated with POBs of AmCPV (Treated control). The mortality was considerably reduced in the larvae treated with the aqueous extracts of leaf, stem, root and flower of *A. zeylanica*. The lowest larva mortality was recorded as 25.26 to 30.46% and 22.28 to 28.92% in 1st and 2nd crop rearing respectively when the larvae were treated with different concentrations of aqueous extracts of flower (T4 × C3, T4 × C2, T4 × C1). The highest mortality among the treatments was observed (50.21 to 59.82% and 47.34 to 60.08%) in 1st and 2nd crop rearing respectively in the treatments with different concentrations of aqueous extracts of stem (T3 × C3, T3 × C2, T3 × C1). In treated control larva mortality was 88.36 and 91.58% in 1st and 2nd crop rearing.

Pooled analysis of data revealed that the maximum reduction in virus infection was of 66.97 to 73.53% in treatment of aqueous extract of flower followed by treatment of leaf (54.94 to 64.83%). The root was least effective in reducing the virus infection (33.34 to 45.73%). The aqueous extract of leaf, stem, root and flower irrespective of concentration were found effective in suppressing the virus infection in tasar silkworm. The aqueous extract of flower reduced the virus infection to the maximum level of 69.88% (T4) followed by 59.47% with treatment of leaf (T1).

In the present study the aqueous extracts of all parts i.e. leaf, stem, root and flower of *A. zeylanica* was found effective in reducing virus infection significantly ($P < 0.05$) compared to treated control. However, aqueous extract of flower was much effective and reduced the virus infection in silkworm to the maximum level, which may be due to its antiviral action as reported by Singh *et al.*, (1999). The observations on antiviral action of plant extracts have been made by Samuel Manohraj (1994) and Mallika (1997) who reported 72.46 and 79.50% reduction in grasserie disease (caused by Nuclear Polyhedrosis Virus) in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. by application of leaf extract of *Psoralea coryleifolia* respectively. Similarly Sivaprakasham (1994) reported that the aqueous extract of *P. coryleifolia* was better than gentamycin and calcium hydroxide in reducing the larval mortality due to grasserie.

Table I. Mortality in silkworm, *Antheraea mylitta* D. after POBs of AmCPV (1×10^5) inoculation and treatment with aqueous extract of *Adhatoda zeylanica*.

Tableau I. Mortalité chez le ver à soie, *Antheraea mylitta* D. après l'inoculation de POB d'AmCPV (1×10^5) et le traitement avec un extrait aqueux d'*Adhatoda zeylanica*.

Treatment	Mortality (%)			% of reduction from inoculated control		
	1 st Crop	2 nd Crop	Pooled	1 st Crop	2 nd Crop	Pooled
Traitement	Mortalité (%)			% de diminution par rapport au témoin inoculé		
	1 ^{ere} récolte	2 ^{ème} récolte	Ensemble	1 ^{ere} récolte	2 ^{ème} récolte	Ensemble
T1 × C1	40.62	40.42	40.52	54.02	55.86	54.94
T1 × C2	38.00	36.18	37.18	56.79	60.49	58.64
T1 × C3	32.56	30.66	31.61	63.25	66.52	64.83
T1 : C	37.12	35.75	36.43	57.99	60.96	59.47
T2 × C1	48.76	45.28	47.02	44.81	50.35	47.68
T2 × C2	46.11	42.67	44.39	47.81	53.40	50.60
T2 × C3	41.36	38.12	39.74	53.19	58.37	55.78
T2 : C	45.41	47.02	43.71	48.60	54.11	51.35
T3 × C1	59.82	60.08	59.95	32.29	34.39	33.34
T3 × C2	56.34	57.59	56.96	36.23	37.11	36.67
T3 × C3	50.21	47.34	48.77	43.17	48.30	45.73
T3 : C	55.45	55.00	55.22	37.24	39.94	38.59
T4 × C1	30.46	28.92	29.69	65.52	68.42	66.97
T4 × C2	28.72	26.78	27.75	67.49	70.75	69.08
T4 × C3	25.26	22.28	23.77	71.41	75.67	73.53
T4 : C	28.14	25.99	27.06	68.15	71.62	69.88
Conc. C1 (1%)	44.91	43.67	44.29	49.17	52.31	50.74
Conc. C2 (2%)	42.33	40.80	41.56	53.09	55.44	53.78
Conc. C3 (3%)	37.34	34.60	35.97	57.74	62.21	59.97
Inoculated control	88.36	91.58	89.97			
Témoin inoculé						
Normal control	8.45	10.82	9.65			
Témoin normal						
SE ±	1.89	2.36	1.52			
Treatment CD 5%	7.93	8.82	7.05			
Traitement DC à 5 %						
Conc. CD 5%	3.46	3.21	2.99			
Interaction CD 5%	6.39	7.54	6.72			

T1 = Leaf / Feuille, T2 = Stem / Tige, T3 = Root / Racine, T4 = Flower / Fleur .

Manimagalai *et al.*, (2000) observed 63% reduction in grasserie disease in *B. mori* with the application of turmeric and chalk powder. The extracts of leaf, root and flower of *A. zeylanica* have been reported for the treatment of bacterial and viral diseases in human being (Singh *et al.*, 1999).

However, the plant extracts tested in the present investigation have not been reported earlier against the virus diseases in silkworm.

Effect of *Antheraea mylitta* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (AmCPV) and plant extract treatment on Total Hemocyte Counts (THC):

The results on the effect of aqueous extracts of *Adhatoda zeylanica* on total hemocyte count in CPV infected worms are presented in Table II. In all the treatments and normal control, the total hemocyte counts increased from 1st day to 6th day and decreased on 7th day after the next moult. In T1 batch the total hemocyte counts was 12650/mm³ of hemolymph and increased to 15432/mm³ by 6th day. On 7th day total hemocyte counts were 14903/mm³. On 8th day the count was increased up to 15625/mm³. The similar trend was observed in all the treatments and normal control. While in inoculated control the counts were increased after inoculation with CPV up to 2nd day of infection. Then there was a decrease for a period ranging from 3-8 days. In normal control the total hemocyte count was significantly low as compared to the treatment because the increase may represent the defense response of silkworm, *A. mylitta* against the invading pathogen. The observed data agreed with earlier workers as they investigated that once entomophagus fungi have penetrated in the host integument and gained access to nutrient-rich hemocoel, they are confronted with host humoral and or cellular defenses (Butt *et al.*, 1988, Butt and Humber, 1989, Vey & Gotz, 1986). As humoral response, the phenoloxidase system will be activated to induce the phagocytic process and melanization which works as toxin to invading microorganism (Tanada and Kaya, 1993).

Table II. Effect of aqueous extract of *Adhatoda zeylanica* on the total hemocyte count in virus infected tasar silkworm.

Tableau II. Effet de l'extrait aqueux d'*Adhatoda zeylanica* sur le compte total en hémocytes chez le ver à soie tasar infesté par le virus.

Treatment	Days post inoculation							
Traitement	Jours après l'inoculation							
	1	2	3	4	5	6	7	8
T1	12650	14266	14810	15266	15407	15432	14903	15625
T2	12750	14305	15000	15530	15833	15903	14856	15457
T3	12507	14199	14850	15271	15632	15509	14650	15259
T4	12500	14236	14607	15111	15527	15543	14230	15008
Inoculated control								
Témoin inoculé	12700	14480	14350	12671	9851	6203	5009	3812
Normal control	12333	12455	12782	13124	13690	13702	12480	13713
Témoin normal								
S.E. ±	132.56	141.21	125.07	106.32	156.78	182.22	191.06	190.23
C. D. at 5%	138.08	151.26	177.12	125.28	256.27	308.15	289.05	331.47

T1 = Leaf / Feuille, T2 = Stem / Tige, T3 = Root / Racine, T4 = Flower / Fleur.

Table III. Differential hemocyte counts after AmCPV infection and treatment with aqueous extract of *Adhatoda zeylanica*.**Tableau III. Comptes différentiels en hémocytes après l'infestation par AmCPV et le traitement avec l'extrait aqueux d'*Adhatoda zeylanica*.**

Treatment	Hemocyte	Days post inoculation							
Traitement	Hémocyte	Jours après l'inoculation							
		1	2	3	4	5	6	7	8
T1	PR	24	22	18	20	23	25	25	26
	PL	33	37	35	35	33	30	30	31
	GR	47	49	50	47	45	42	38	40
	SP	15	15	18	23	23	25	26	26
	OE	5	4	4	4	6	9	8	8
	VER	-	2	-	2	-	-	-	-
	DEG	15	20	18	14	14	12	11	10
T2	PR	29	25	20	21	25	26	27	30
	PL	31	37	42	37	36	34	32	34
	GR	48	50	54	49	47	42	40	41
	SP	18	17	15	15	19	20	22	22
	OE	8	6	8	8	9	10	11	12
	VER	-	-	-	-	-	-	1	-
	DEG	14	18	25	20	16	12	11	11
T3	PR	30	25	18	20	23	26	28	29
	PL	39	43	45	44	41	38	37	37
	GR	45	55	56	57	49	42	37	39
	SP	23	20	20	21	22	24	24	25
	OE	8	6	5	5	6	6	7	8
	VER	1	-	-	-	-	-	-	-
	DEG	20	25	23	27	20	18	16	15
T4	PR	24	23	21	19	24	24	26	27
	PL	39	41	44	41	39	36	35	37
	GR	42	47	48	48	43	40	39	41
	SP	25	25	24	19	20	22	22	25
	OE	8	7	6	8	9	8	9	10
	VER	1	-	-	-	-	-	-	-
	DEG	12	16	15	17	12	12	10	9
Inoculated Control									
Témoin inoculé		1	2	3	4	5	6	7	8
	PR	28	25	24	23	18	17	15	12
	PL	33	39	44	42	38	35	32	25
	GR	35	45	48	52	44	41	32	27
	SP	24	20	18	17	15	14	12	9
	OE	13	11	10	8	8	5	4	3
	VER	1	-	-	-	-	-	-	-
	DEG	22	24	25	26	30	37	39	42

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

Treatment	Hemocyte	Days post inoculation							
Traitement	Hémocyte	Jours après l'inoculation							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Normal control									
<i>Témoin normal</i>	PR	22	25	27	29	30	33	34	35
	PL	32	33	35	37	39	41	37	38
	GR	35	36	38	39	42	40	38	38
	SP	17	18	20	22	25	26	27	28
	OE	5	6	8	10	10	12	13	15
	VER	-	-	-	-	4	1	-	-
	DEG	10	12	13	14	16	9	7	8

PR = Prohemocyte

PL = Plasmotocyte

GR = Granulocyte

SP = Spherulocyte

OE = Oenocytoid

VER = Vermiform cell / *Cellule vermiforme*DEG = Degenerated cell / *Cellule dégénérée*

The cellular responses to infection have been worked out in many insects by earlier workers (Chain and Anderson, 1982; Dunn and Drake, 1983; Horohove and Dunn, 1983). Similar observations have also been made by Mallikarjuna *et al.*, (2002) in his study on the effect of systematic fungicide on the total hemocyte count in *Beauveria bassiana* infected silkworm, *Bombyx mori*. Salt (1970) reported that Hemocytes are extremely efficient in removing pathogens by accomplishing a series of reactions designated as phagocytosis, nodule formation or encapsulation. The present observations are in agreement with the earlier investigation that the number of hemocytes may increase (Balavenkatasubaiah *et al*, 2001) and decrease (Gillium and Shimanuki, 1967) to counter foreign body when infected. On the basis of the above findings of the earlier workers it is evident that CPV induce the defense response through multiplication of hemocytes, as is indicated by the increase in total hemocyte counts of the hemolymph of the worms.

Effect of *Antheraea mylitta* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (AmCPV) and plant extract treatment on Differential Hemocyte Counts (DHC):

The observation with regard to DHC in silkworm, *Antheraea mylitta* D. after POBs of CPV (1×10^5) inoculation and treatment with aqueous extracts of *Adhatoda zeylanica* is depicted in Table III

The prohemocyte and spherulocytes decreased up to 4th day and increasing trend was observed from 5th day onwards in all the treatments where the worms were first inoculated with AmCPV (1×10^5) and then treated with aqueous extracts of *Adhatoda zeylanica*. While during progressive

infection the gradual decrease in number of prohemocyte, spherulocytes and oenocytoid viz., 28-12, 24-9 and 13-3 respectively was noticed in inoculated control where worm were inoculated with AmCPV (1×10^5). In the normal control (free from pathogen and treatment) all the recorded hemocytes showed an increasing trend during developmental period and number of degenerated cells was comparatively less than the plant extract treatments and Inoculated control.

The number of plasmatocytes and granulocytes increased up to 4th day and then decreased in all the treatments. However, more or less similar observations have been recorded in inoculated control and in normal control. On 8th day there is a slight increase in the number of hemocytes observed in the treatments. The increasing trend in number of these hamocytes was not high in treatments as compared to the inoculated control because of the possibility of interaction of both pathogen and treatment.

The number of prohemocytes decreased due to the conversion of prohemocytes to other types of hemocytes during course of infection and number of plasmatocytes and granulocytes increased as both are involved in defense mechanism against entry of pathogens. The plasmatocyte and granulocytes function in defense against largest foreign bodies in *Bombyx mori* L. was worked out by Satto *et al.*, (1976) and Akai and Sato (1976). The number of oenocytoids was less in all the treatment including inoculated and normal control and ranged from 3 to 15. Few vermiform cells, synonyms of plasmatocyte (Lee and Gilbert, 1966; Devauchelle, 1971), were recorded in both the treatments and control.

REFERENCES

- AIZAWA K. (1971) Structure of polyhedra and virus particles of cytoplasmic polyhedrosis, In the cytoplasmic polyhedrosis of the silkworm (Eds: Aruga, H. and Tanada, Y.) Univ. Tokyo press, Tokyo, pp. 23-36.
- AKAI H. & SATO S. (1976) Surface ultrastructure of larval haemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., 5: 17-21.
- ARNOLD J. W. (1979) Controversies about haemocyte types in insects; In: Insect Hemocytes, A. Gupta (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 231 – 258.
- BALAVENKATASUBBAIAH M., NATRAJU B., THIAGRAJAN V. & DATTA R. K. (2001) Hemocyte counts in different breeds of silkworm, *Bombyx mori* L., and their changes during progressive infection of BmNPV. Indian J. Seric., 40(2): 158-162
- BUTT T. M. & HUMBER R. A. (1989) Response of gypsy moth hemocytes to natural fungal protoplasts of three Entomophagous species (Zygomycotina: Entomophthorates). J. Invertebr. Pathol., 53: 121-123.
- BUTT T. M. & SHIELDS S. K. (1996) The structure and behaviour of gypsy moth (*Lymantria dispar*) hemocytes. J. Invertebr. Pathol., 68: 1-14.
- BUTT T. M., WRAIGHT S. P., GALAINI S., WRAIGHT, R. A., HUMBER W. A. ROBERTS & SOPER R. S. (1988) Humoral encapsulation of the fungus *Erynia radicans* (Entomophthorates) by potato leaf hopper, *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) J. Invertebr. Pathol., 52: 49-56
- CHAIN B. M. & ANDERSON R. S. (1982) Selective depletion of the plasmatocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria. J. Insect Physiol., 28: 377-384.
- DEVAUCHELLE G. (1971) Etude ultrastructurale dehemocytes du *Coleoptere Melolontha melolontha* (L). J. Ultrastruct. Res., 34:492 - 516
- DUNN P. E. (1986) Biochemical aspects of insect immunology. Ann. Rev. Entomol., 31: 321-339.
- DUN P. E. & DRAKE D. R. (1983) Fate of bacteria injected into native and immunized larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Invertebr. Pathol., 41: 77-85
- GILIUM M. & SHIMANUKI H. (1967) *In vitro* phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey bee hemocytes. J. Invertebr. Pathol., 9: 387-389
- GUPTA A. P. (1979) Hemocyte types : their structures, synonyms, interrelationship and taxonomic significance. In Insects Hemocytes, , Cambridge University, Cambridge. pp 85-127

- GUPTA A. P. (1986) Arthropod immunocytes: Identification, structure, functions and analogies to the functions of vertebrate B – and T- lymphocytes. In: Hemocytic and Humoral Immunity in arthropods, A. P. Gupta (Ed.), John Wiley, New York, pp. 3-59.
- HOROHOF D. W. & DUNN P. (1982) Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following infection of Bacteria. J. Invertebr. Pathol., 40:327-339.
- HOROHOF D. W. & DUNN P. E. (1983) Phagocytosis and nodule formation by hemocytes of *Manduca sexta* larvae following injection of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Invertebr. Pathol., 41: 203-213
- JESPER A. B. K. & WARD M. A. De (1993) Natural products in plant protection. Netherland J. Pl. Path., 99 (suppl. 3): 109-117.
- JONES J. C. (1962) Current concepts concerning insect hemocytes Am. Zool., 2:209-246
- JONES J. C. (1964) The circulatory system of insects, In: The physiology of insecta, M. Rockstein (Ed.) Academic press, New York, 3: 1-107
- JONES J. C. (1970) Hemocytes in insects. In: Regulation of hematopoiesis, A. S. Gordon (Ed.), Appleton – Century Crofts, New York, 1: 7-65
- JONES J. C. (1979) Pathway and pitfalls in the classification and study of insect hemocytes. In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions and Techniques, A. P. Gupta 9Ed., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 279 – 300.
- KUMAR S., SINGH J & Sharma A. (1999) Asian Region Inventory of Medicinal and Aromatic Plants and Polyherbal Formulations. Dept. Of Biotechnology, New. Delhi, India. pp.191.
- KUMAR V., BALAVENKATASUBBIAH M., NATARAJU B. & DATTA R. K. (1998) Use of plant extracts for prevention of nuclear polyhedrosis of silkworm, *Bombyx mori* L., Annual Report , CSR & TI, Mysore, pp 73
- LEA M. S. (1985) A *Sericesthis iridescent* virus infection of the haemocytes of the wax moth *Galleria mellonella*: Effects on the total and differential counts and haemocyte ontogeny. J. Invertebr. Pathol., 48: 42-51.
- LEA M. S. & GILBERT L. I. (1966) The hemocytes of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera). J. Morphol. 118 (2):197 – 216
- MALLIKA N. (1997) Biodiversity of nuclear polyhedrosis virus of *Bombyx mori* L. and management of grasserie disease. M.Sc.(Ag). Thesis, Tamilnadu agriculture University, Coimbatore, Indis. pp 76.
- MALLIKARJUNA M., BALAVENKATASUBBIAH M., NATARAJU B. & THIAGRAJAN V. (2002) Effect of systemic fungicide on total hemocyte count and hemolymph biochemical changes in silkworm, *Bombyx mori* L., infected with *Beauveria bassiana*. Int. J. Indust. Entomol., 5(2): 189-194
- MANIMEGALAI S., SUBRAMANIAN A. & CHANDRAMOHAN N. (2000) Efficacy of bed disinfectants and botanicals against grasserie disease of silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 40 (4): 585-590.
- NITTONO Y. (1960) Studies on the blood cells in the silkworm, *Bombyx mori* L. Bull. Seric. Expt. Stn., 16: 261-266.
- PECH I. I., TRUDEAU D. & STRAND M. (1995) Effects of basement membrane on the behaviour of hemocytes from *Pseudoplasma indudens* (Lepidoptera : Noctuidae). Development of an in vitro encapsulation assay. J. Insect Physiol., 41: 801-807.
- RATCLIFFE N. A (1993) Cellular defense response of Insects. Unsolved problems. In Parasites and Pathogens of Insects (N. E. Beckage, S. N. Thompson and B. A. Frederici. Sds.). Academic Press. San Diego. Vol. 1. pp 267 – 304
- RATCLIFFE N. A. & ROWLEY A. F. (1979) Cellular defense reactions of insect hemocytes in vitro: Phagocytosis in a new suspension culture system. J. Invertebr. Pathol., 26 : 225 –233.
- RUSSO J. A., NENON M. R. & BREHELIN M. (1993) The hemocytes of the mealy bugs *Phenacoccus manihoti* and *Planococcus citri* (Insecta: Homoptera) and their role in capsule formation. Can. J. Zool., 72: 252 – 258.

- SAHAY D. N., ROY D. K. & ALOK SAHAY (2000) Diseases of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., Symptoms and control measures, In: Lessons on Tropical Tasar. Ed. By K. Thangavelu, Central Tasar Research and training Institute, Piska Nagri, Ranchi, pp 104
- SALT G. (1970). The cellular defense reactions of insects. Cambridge. Monograph in Experimental Biology, , Cambridge Univ, Press. London. No.16
- SAMUEL MANOHRAJ K. (1994) Effect of certain botanicals on the nuclear polyhedrosis virus disease of *Bombyx mori* L. M.Sc. (Sericulture) Thesis, Tamilnadu Agriculture University, Coimbatore, India. pp.62.
- SARAN S. K., MISHRA P. K., KUMAR D., SINGH B. M. K., SINHA B. R. R. P., RAIS. & PANDEY P. N. (2002) Effect of total and differential hemocyte counts due to infection of *Nosema* species in *Antheraea mylitta* D. (Lepidoptera: Saturniidae) larvae. XIXth Congress of the International Sericultural Commission Proceedings. 21st – 25th Sept., Bangkok, Thailand. pp 308 – 311.
- SATO S., AKAI H. & SWADA H. (1976) An ultrastructural study of capsule formation by *Bombyx mori* L. Annot. Zool. Jpn., 49: 177-88.
- SINGH G. P., ALOK SAHAY, ROY D. K., SAHAY D. N., KULSHRESHTHA V., ROY G. C. & SINHA B. R. R. P. (2004) Efficacy of botanicals against virosis in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. National Workshop on Potential and Strategies for Sustainable Development of Vanya Silks in the Himalayan States. Nov. 8-9, 2004 (Ed. S. Chakrabarti), pp. 260-263
- SINGH J., SHARMA A., SINGH S. C. & KUMAR S. (1999) Medicinal plants for Bioprospection. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow, India. pp. 45 – 57.
- SIVAPRAKASHAM N. (1994) Seasonal incidence of nuclear polyhedrosis virus disease of silkworm *Bombyx mori* L. and its management. Ph.D. thesis, Tamilnadu Agriculture University, Coimbatore, India. pp.112.
- SNEDECOR G. W. & COCKRON W. E. (1971) Statistical Methods. Oxford IHB Publishing Co. New Delhi, pp. 339 – 361.
- TANDA Y. & KAYA H. K. (1993). Insect Pathology, Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 529
- TAUBER O. E & YEAGER J. E. (1934) On the total hemolymph(blood) cell count of the field cricket *Gryllus assimillis pennsylvanicus*. J. Sci., 9: 13-24.
- TAUBER O. E. & YEAGER J. E (1935) On the total blood counts of insects. I. Orthoptera, Odonata, Hemiptera and Homoptera. Ann. Entomol. Soc. Am., 28: 229-240.
- VEY A. & GOTZ (1986) Anti-fungal cellular and defense mechanism in insects. In "Hemocytic and humoral immunity in Arthropods" (A. P. Gupta, ed.), New york pp. 90-115.

ACTION ANTIVIRALE DE PHYTO-EXTRAITS CONTRE LE VIRUS DE LA POLYEDROSE CYTOPLASMIQUE ET SON EFFET SUR LE COMPTE TOTAL ET DIFFERENTIEL EN HEMOCYTES CHEZ LE VER A SOIE TASAR, *ANTHERAEA MYLITTA* D.

**G. P. SINGH, S. B. ZEYA, VARUN KULRESHTHA, N. G. OJHA &
N. SURYANARAYANA**

Silkworm Pathology Laboratory, Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi – 835 303, Inde.

*Les maladies du ver à soie sont la principale contrainte dans la production de cocons. Parmi les maladies du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* D., la virose, provoquée par le virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV) est très contagieuse et est la plus répandue. Nous avons testé l'action antivirale de l'extrait aqueux de différentes parties d'*Adhatoda zeylanica*, connu pour leurs propriétés antivirales contre l'infestation par le virus de la polyédrose cytoplasmique. On a aussi observé l'influence de l'extrait de fleur, la partie la plus efficace de cette plante, par rapport aux changements hématologiques constatés chez les larves de ver à soie infestées par le virus de la polyédrose cytoplasmique. Un extrait aqueux des fleurs d'*A. zeylanica* à 3 % (T4 × C3) s'avère le plus efficace, il diminue la mortalité chez les larves due à l'infestation par le virus au niveau de 23,77 % par rapport au témoin inoculé (89,97 %). On observe que le compte total en hémocytes augmente dans l'hémolymph jusqu'au 6^{ème} jour après l'inoculation chez les lots traités avec des phyto-extraits tandis que chez le témoin inoculé, l'augmentation se fait au bout de 3 jours, ce qui indique que la réponse positive se fait par l'intermédiaire des hémocytes chez les vers à soie traités avec le phyto-extrait. Au bout de deux jours chez le témoin inoculé, alors que la multiplication de CPV augmente, la capacité de défense du ver à soie diminue. De même, le compte différentiel en hémocytes, est différent de celui du témoin inoculé. Les pro-hémocytes, les plasmatocytes, les granulocytes, les pro-hémocytes sont maximums en nombre, tandis que les oenocytoïdes sont minimum en nombre. Le nombre de cellules sanguines dégénérées augmente chez le témoin inoculé jusqu'au 8^{ème} jour après l'inoculation. On observe donc que les hémocytes impliqués dans le mécanisme de défense contre CPV et le phyto-extrait empêchent la multiplication du virus, en améliorant la réponse de défense par l'intermédiaire des hémocytes.*

INTRODUCTION

Le ver à soie tasar souffre de virose, une maladie virale provoquée par le virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV), qui induit une perte de cocons de 25 à 30 % dans les récoltes (Sahay et coll., 2000). Compte tenu du coût élevé des produits chimiques et des antibiotiques et de leurs conséquences risquées, à l'heure actuelle, la priorité est à l'utilisation de matériaux biodégradables comme les extraits de plantes frais pour lutter contre les maladies chez les plantes (Jesper et Ward, 1993) et les animaux (Kumar et coll., 1999). On a rapporté que les phyto-extraits permettent de lutter contre la maladie de la grasserie (provoquée par le virus de la polyédrose nucléaire) chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. (Kumar et coll., 1998 ; Manimegalai et coll., 2000) et la virose (provoquée par CPV) chez le ver à soie tasar, *A. mylitta* D. (Singh et coll., 2004).

Les insectes présentent une réponse défensive grâce aux composants cellulaires et humoraux (Dunn, 1986, Gupta, 1986). Les réactions humorales impliquent une synthèse lente des principes antibactériens et antiviraux et demandent plusieurs heures pour s'exprimer pleinement. Les réponses cellulaires sont les interactions directes entre les hémocytes circulants et les matériaux envahissants. L'interaction est immédiate et inclut la phagocytose, la nodulation et l'encapsulation (Gupta, 1986). Chez les insectes, on observe plusieurs types d'hémocytes dans l'hémolymph (Gupta, 1979, Arnold, 1979, Jonesh, 1979, Russo et coll., 1993, Butt et Shields, 1996). Nittono (1960) et Saran et coll., (2002) ont classifié les cellules sanguines chez le ver à soie, *B. mori* L. et *A. mylitta* en six types, c'est-à-dire les pro-hémocytes, les plasmatocytes, les granulocytes, les sphérulocytes, les sphérulocytes imaginaires et les oenocytes. On a rapporté que les hémocytes ont une variété de fonctions comme la mécanisation et l'immobilisation de l'organisme envahissant par l'encapsulation et / ou la phagocytose, la réparation des blessures, la coagulation (Jonesh, 1964, 1970, Ratcliffe et Rowley, 1979, Ratcliffe, 1993, Pech et coll., 1995).

Il existe des rapports sur l'effet de pathogènes variés chez les insectes (Horohove et Dunn, 1982, Lea, 1985, 1986), cependant, il existe peu de rapports sur l'influence des phyto-extraits par rapport à la défense hématologique chez les insectes infestés par CPV. Dans cette étude, grâce au compte total et différentiel en hémocytes chez le ver à soie tassar infesté par CPV, nous rapportons l'influence de phyto-extraits d'*Adhotoda zelanica* (qui a des propriétés antivirales) sur les réponses par l'intermédiaire des hémocytes.

MATERIELS ET METHODES

On sélectionne et on se procure *Adhatoda zeylanica* Medic., une plante médicinale qui appartient à la famille des Acanthaceae, connue pour ses propriétés antibiotiques (Singh et coll., 1999) et disponible localement pour tester son efficacité contre la virose chez le ver à soie tassar, *A. mylitta* D. et son influence sur la défense hématologique. On confirme l'identification de la plante auprès de *Botanical Survey* en Inde. On prépare les extraits aqueux des parties des plantes en broyant 50 g de parties de la plante fraîche propre et lavée (feuille / tige / racine / fleur) dans un peu d'eau, en les filtrant au travers d'une mousseline et en constituant un volume de 100 ml. On centrifuge les extraits de plantes ainsi préparés à 3000 tpm pendant 15 min. dans une centrifugeuse angulaire fixe Remi R23 avec une capacité des tubes de 100 ml. On augmente le volume final à 100 ml avec de l'eau distillée pour amener la concentration mère à 50 %. On dilue à nouveau les solutions mères à la concentration désirée avec de l'eau distillée avant l'utilisation.

Inoculum du virus de la polyédrose cytoplasmique d'*Antheraea mylitta* (AmCPV) :

On prépare un inoculum frais du virus de la polyédrose cytoplasmique à partir d'un ver à soie malade d'*A. mylitta*. On homogénéise l'intestin moyen complètement blanchi, obtenu à partir du ver à soie atteint par la polyédrose cytoplasmique à un stade avancé d'infestation, dans de l'eau distillée stérile. On filtre la suspension polyédrique 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 électronique la pureté du culot qui en résulte dans de l'eau distillée. On prépare la suspension polyédrique dans de l'eau distillée stérile pour qu'elle contienne 1×10^5 polyèdres / ml.

Inoculation des Corps d'occlusion des polyèdres (POBs) d'AmCPV et traitement des larves avec des extraits de plantes :

On inocule oralement les larves de vers à soie de l'ecorace Daba (en les nourrissant avec des feuilles de la plante hôte enduites de suspensions de polyèdres) avec 200 μ l d'inoculum de polyèdres d'AmCPV (1×10^5 polyèdres / ml) 24 h après la 2^{ème} mue. Après 6 h d'inoculation du virus et une fois au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} âge, on laisse les larves se nourrir sur des feuilles de *Terminalia tomentosa*

(asan), traitées avec un extrait aqueux de feuille, de tige, de racine ou de fleur d'*A. zeylanica* à 1, 2 et 3 %. On maintient trois répétitions avec 50 larves de vers à soie pour chaque traitement et concentration pour observer les effets des phyto-extraits sur l'infestation par le virus. Pour les observations sur l'influence des extraits par rapport à la défense hématologique, on maintient un lot séparé de vers à soie sur des feuilles fraîches de la plante hôte, jusqu'à la 4^{ème} mue. Après la 4^{ème} mue, on inocule oralement les larves en trois répétitions avec les POB d'AmCPV (1×10^5) et on donne les deux repas suivants avec des feuilles traitées séparément, avec de l'extrait aqueux de feuille, de tige, de racine ou de fleur d'*A. zeylanica*. On élève les lots traités et témoins sur de la feuille de la plante hôte primaire, *Terminalia tomentosa* (Asan) pendant deux saisons d'élevage (juillet – août et septembre – octobre), dans des conditions normales d'élevage à l'intérieur, jusqu'au filage.

Estimation du compte en hémocytes :

On détermine chaque jour l'estimation des comptes totaux en hémocytes (THC) dans l'hémolymph de tous les lots traités et témoins en suivant la méthode décrite par Tauber et Yeager (1934, 1935), en utilisant un hémocytomètre. On estime les THC par mm^3 d'hémolymph selon la formule suggérée par Jonesh (1962). Chaque jour, du jour 0 au jour 8, on recueille 6 larves de chaque répétition, puis on recueille l'hémolymph des 6 larves dans trois tubes eppendoff (2 hémolymphes larvaires / tube) sur de la glace et on les stocke à 4° C. Un total de 6 tubes représente 3 recueils de répétitions. On estime le compte différentiel en hémocytes (DHC), en comptant les différents hémocytes sur une population d'hémocytes de 200. On identifie les différents hémocytes d'après les caractères morphologiques, selon la description de Nittono (1960).

On procède à des observations sur le développement des symptômes de la maladie de la virose et sur la mortalité larvaire et sur les comptes en THC et en DHC. On examine au microscope les larves mortes pendant l'élevage avec les différents traitements, par rapport à la présence des pathogènes concernés. On analyse statistiquement les données enregistrées par rapport à la mortalité provoquée par les pathogènes concernés et on analyse les THC en utilisant une Conception Complètement Aléatoire.

RESULTATS ET DISCUSSION

Effet des extraits de plante sur la virose :

On procède aux observations (Tableau I) par rapport à la mortalité, provoquée par la virose chez le ver à soie, après l'inoculation avec les POBs d'AmCPV et le traitement avec les extraits aqueux d'*Adhatoda zeylanica*.

Les résultats révèlent que la mortalité des larves due à l'infestation par le virus est plus élevée chez les larves inoculées avec les POB d'AmCPV (témoin traité). La mortalité diminue considérablement chez les larves traitées avec les extraits aqueux de feuille, de tige, de racine et de fleur d'*A. zeylanica*. On enregistre la mortalité larvaire la plus faible de 25,26 à 30,46 % et de 22,28 à 28,92 % respectivement pendant l'élevage de la 1^{ère} et de la 2^{ème} récolte, quand on traite les larves avec différentes concentrations des extraits aqueux de fleur ($T4 \times C3$, $T4 \times C2$, $T4 \times C1$). Parmi les traitements, on observe la mortalité la plus élevée pendant l'élevage respectivement de la 1^{ère} et de la 2^{ème} récoltes (50,21 à 59,82 % et 47,34 à 60,08 %) avec les traitements aux différentes concentrations d'extraits aqueux de tige ($T3 \times C3$, $T3 \times C2$, $T3 \times C1$). Chez le témoin traité, la mortalité larvaire est de 88,36 % et de 91,58 % pendant l'élevage de la 1^{ère} et de la 2^{ème} récoltes.

L'analyse regroupée des données révèle que la diminution maximum de l'infestation par le virus est de 66,97 à 77,53 % avec le traitement d'extrait aqueux de fleur, suivi par le traitement de feuille (54,94 à 64,83 %). La racine est la moins efficace pour diminuer l'infestation par le virus (33,34 à 45,73 %). L'extrait aqueux de feuille, de tige, de racine et de fleur, quelle que soit la concentration, s'avère efficace pour supprimer l'infestation par le virus chez le ver à soie tassar. L'extrait aqueux de

fleur diminue l'infestation par le virus au niveau maximum de 69,88 % (T4), suivi par 59,47 avec le traitement à base de feuille (T1).

Dans cette étude, les extraits aqueux de toutes les parties, c'est-à-dire la feuille, la tige, la racine et la fleur d'*A. zeylanica* s'avèrent efficaces pour diminuer l'infestation par le virus de manière significative ($P < 0,05$), par comparaison au témoin traité. Cependant, l'extrait aqueux de fleur est beaucoup plus efficace et diminue l'infestation par le virus chez le ver à soie au niveau maximum, ce qui pourrait être dû à son action antivirale comme l'ont rapporté Singh et coll., (1999). Samuel Manohraj (1994) et Mallika (1997) ont procédé à des observations sur l'action antivirale des extraits de plantes et ont rapporté une diminution de la maladie de la grasserie (provoquée par le virus de la polyédrose nucléaire) de respectivement 72,46 et 79,50 % chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. par l'application d'extrait de feuille de *P. coryleifolia*. De même, Sivaprakasham (1994) a rapporté que l'extrait aqueux de *Psoralea coryleifolia* est meilleur que la gentamycine et l'hydroxyde de calcium pour diminuer la mortalité larvaire provoquée par la grasserie.

Manimegalai et coll., (2000) ont observé une diminution de la maladie de la grasserie de 65 % chez *B. mori* avec l'application de safran et de poudre de chaux. Un rapport a été publié sur les extraits de feuille, de racine et de fleur d'*A. zeylanica* pour le traitement des maladies bactériennes et virales chez l'être humain (Singh et coll., 1999).

Cependant, il n'y a pas eu de rapport antérieur sur les extraits de plantes testés dans cette étude contre les maladies virales chez le ver à soie.

Effet du virus de la polyédrose cytoplasmique chez *Antheraea mylitta* (AmCPV) et du traitement d'extrait de plante sur les comptes totaux en hémocytes (THC) :

Les résultats sur l'effet des extraits aqueux d'*Adhatoda zeylanica* sur le compte total en hémocytes chez les vers infestés par CPV sont présentés dans le Tableau II. Chez tous les traitements et chez le témoin normal, les comptes totaux en hémocytes augmentent du 1^{er} au 6^{ème} jour et baissent le 7^{ème} jour après la mue suivante. Chez le lot T1, les comptes totaux en hémocytes sont de 12650 / mm³ d'hémolymphe et augmentent jusqu'à 15432 / mm³ au 6^{ème} jour. Le 7^{ème} jour, les comptes totaux en hémocytes sont de 14903 / mm³. Au 8^{ème} jour, le compte augmente jusqu'à 15625 / mm³. On observe une tendance similaire chez tous les traitements et chez le témoin normal. Tandis que chez le témoin inoculé, les comptes augmentent après l'inoculation avec le CPV jusqu'au 2^{ème} jour d'infestation. Puis, il y a une baisse pendant une période comprise entre 3 à 8 jours. Chez le témoin normal, le compte total en hémocytes est significativement faible par comparaison au traitement, parce que l'augmentation pourrait représenter une réponse défensive du ver à soie, *A. mylitta* contre le pathogène envahissant. Les données observées sont en accord avec des données précédentes obtenues au cours de recherches sur des champignons entomophages, qui montrent qu'une fois qu'ils ont pénétré dans le tégument de l'hôte et gagné accès à l'hémocoelome riche en nutriments, ils sont confrontés aux défenses humérales de l'hôte et / ou aux défenses cellulaires (Butt et coll., 1988, Butt et Humber, 1989, Vey et Gotz, 1986). En tant que réponse humorale, le système de phénol oxydase sera activé pour induire le processus phagocytaire et la mélanisation, qui agit comme une toxine par rapport au micro-organisme envahissant (Tanada et Kaya, 1993). Des chercheurs ont déjà élucidé les réponses cellulaires par rapport à l'infestation chez de nombreux insectes (Chain et Anderson, 1982 ; Dunn et Drake, 1983 ; Horohove et Dunn, 1983). Mallikarjuna et coll., (2002) ont aussi fait des observations similaires dans leur étude sur l'effet du fongicide systématique sur le compte total en hémocytes chez le ver à soie *Bombyx mori*, infesté par *Beauveria bassiana*. Salt (1970) a rapporté que les hémocytes sont extrêmement efficaces pour éliminer les pathogènes, en accomplissant une série de réactions désignées en tant que phagocytose, formation de nodules ou encapsulation. Les observations actuelles sont en accord avec l'étude antérieure, selon laquelle le nombre d'hémocytes pourrait augmenter (Balavenkatasubaiyah et coll., 2001) et baisser (Gillium et Shimanuki, 1967) pour contrer les corps étrangers quand il s'est produit une infestation. Sur la base des résultats obtenus au cours de recherches

antérieures, il est évident que CPV induit une réponse défensive par la multiplication des hémocytes, comme l'indique l'augmentation des comptes totaux en hémocytes dans l'hémolymphe des vers.

Effet du virus de la Polyédrose Cytoplasmique d'*Antheraea mylitta* (AmCPV) et du traitement à base d'extrait de plante sur les Comptes Différentiels en Hémocytes (DHC) :

Les observations par rapport au DHC chez le ver à soie, *Antheraea mylitta* D. après l'inoculation de POB de CPV (1×10^5) et le traitement avec des extraits aqueux d'*Adhatoda zeylanica* sont présentées dans le Tableau III.

Les prohémyocytes et les sphérulocytes baissent jusqu'au 4^{ème} jour et on observe une tendance à la hausse à partir du 5^{ème} jour, avec tous les traitements où les vers sont d'abord inoculés avec AmCPV (1×10^5), puis traités avec des extraits aqueux d'*Adhatoda zeylanica*. Tandis que pendant l'infestation progressive, on remarque la baisse progressive du nombre des prohémyocytes, des sphérulocytes et des oenocytoïdes, c'est-à-dire respectivement de 28 à 12, de 24 à 9 et de 13 à 3 chez le témoin où le ver est inoculé avec AmCPV (1×10^5). Chez le témoin normal (sans pathogène et sans traitement), tous les hémocytes enregistrés présentent une tendance à l'augmentation pendant la période de développement et le nombre de cellules dégénérées est comparativement moins important que pour les traitements à base d'extraits de plantes et que pour le témoin inoculé.

Le nombre de plasmatocytes et de granulocytes augmente jusqu'au 4^{ème} jour, puis baisse avec tous les traitements. Cependant, on a procédé à des observations similaires chez le témoin inoculé et chez le témoin normal. Le 8^{ème} jour, il se produit une légère augmentation du nombre d'hémocytes observés avec les traitements. La tendance à l'augmentation du nombre des hémocytes n'est pas élevée avec les traitements, par comparaison au témoin inoculé, en raison de la possibilité d'une interaction entre à la fois le pathogène et le traitement.

Le nombre de prohémyocytes baisse en raison de la conversion des prohémyocytes en d'autres types d'hémocytes, au cours de l'infestation et le nombre de plasmatocytes et de granulocytes augmente puisqu'ils sont tous les deux impliqués dans le mécanisme de défense contre l'entrée des pathogènes. Satto et coll., (1976) et Akai et Sato (1976) ont élucidé la fonction des plasmatocytes et des granulocytes dans la défense contre les plus grands corps étrangers chez *Bombyx mori* L. Le nombre d'oenocytoïdes est moins important avec tous les traitements, y compris chez les témoins inoculé et normal et est compris entre 3 et 15. On a enregistré quelques cellules vermiformes, synonymes de plasmatocytes (Lee et Gilbert, 1966 ; Devauchelle, 1971) à la fois chez les traitements et chez le témoin.

INFLUENCE OF SENESCENCE ON THE GROWTH AND YIELD PARAMETERS OF MULBERRY UNDER TEMPERATE CONDITIONS

M. R. MIR, R. KOUR, ANIL DHAR, HAROON RASHID & M. A. KHAN

Central Sericultural Research & Training Institute Pampore J& K-192121 India.

Before entering dormancy, mulberry like most other plants, sheds its leaf and remains inactive during the winter months under Kashmir climatic conditions. Manual leaf plucking before the onset of senescence for use in livestock feeding or autumn crop of the silkworm rearing has been found to reduce the vigour and yielding capacity of mulberry in the following spring. The leaf if left intact to undergo natural shedding and senescence has been found to increase the yielding capacity of mulberry plants upto an extent of more than 30 percent besides adding to its general growth and vigour.

Keywords: Mulberry, temperate, senescence, growth, sprouting.

INTRODUCTION

Under temperate climatic conditions, mulberry (*Morus sps.*) with a fall in temperature sheds its leaf during 2nd or 3rd week of November and remains dormant for a period of about four months (Baksh *et al.*, 1997). The winter buds start sprouting again from second fortnight of March onwards (Baksh *et al.*, 1998). The leaves gradually increase in size and are fed to the silkworm during May-June (spring crop) which is the main commercial crop at farmers' level. For this crop the leaf for the vth stage larvae is harvested along with the shoots for saving time, space and labour, besides retaining the moisture in leaf comparatively for longer durations (Kamili and Masoodi, 2000). The plants are, therefore, pruned at crown height and are thus resorted to basal pruning. The buds sprout again and the shoots attain a very good height upto the end of September. The shoots bear very luxuriant leaf which attracts the livestock holders and farmers. The leaf is mostly plucked and fed to sheep, goat and in some cases to silkworm for taking the second crop during second fortnight of August to first fortnight of September. The plants which are subjected to this manual leaf plucking during early autumn appear to be weaker as compared to the plants where the leaf is left intact and allowed to undergo natural senescence at its proper time. A study was therefore taken up to see the role of senescence and the additive effect of intact autumn leaf on the growth and yield of mulberry during the following spring.

MATERIAL AND METHODS

The study was taken up at CSR&TI Pampore which is situated at 30° 12' North latitude and 75° 35' East longitude and 2000 meters above the sea level. Here the temperature goes even below 0° C during the winter months. The material for the study consisted of well grown plants of mulberry maintained as dwarf under rainfed conditions. The plants were maintained as per the recommended package of practices. The genotype taken was Gosherami as it is one among the top ranking genotypes

as far as leaf yield and quality are concerned (Fotadar *et al.*, 1998; Mir *et al.*, 2003). Furthermore the plantation at farmers level mostly consists of this genotype. The study was taken up as per the following treatments:

T1 = Plants left to undergo natural senescence, i.e., 0% leaf plucking

T2 = Manual leaf plucking partially, i.e., 50% leaf plucked and 50% left to senescise

T3 = Full leaf (100%) plucked manually

Table I. Influence of Senescence on the growth and yield parameters of mulberry.

Tableau I. Influence de la sénescence sur les paramètres de croissance et de rendement du mûrier.

Parameters	Natural senescence (T1)	50% manual plucking (T2)	100% manual leaf plucking (T3)	C.D. (5%)	Increase in natural senescence over	
					(T2)	(T3)
Paramètres	Sénescence naturelle (T1)	50 % de cueillette manuelle (T2)	100 % de cueillette manuelle des feuilles (T3)		Augmentation pour la sénescence naturelle par rapport à	
					(T2)	(T3)
Sprouting (%) of winter buds % de bourgeonnement des bourgeons d'hiver	78.20	75.31	66.86	2.83.	2.71 (3.60)	11.16 (16.69)
Damage due to frost Dégâts créés par le gel	1.57	2.27	12.57	2.40	(- 30.84)	(- 87.51)
Fresh weight of 100 leaf Poids frais de 100 feuilles	406.55	404.55	386.79	15.84	2.00 (0.49)	19.76 (5.11)
No. of shootlets/ plant Nbre de rameaux / plant	136.10	131.14	113.96	13.00	4.96 (3.78)	22.14 (19.43)
Length of longest shoot (cm) Longueur de la pousse la plus longue (cm)	64.88	60.70	58.53	4.53	4.18 (6.44)	6.35 (10.85)
Total shoot length Longueur totale des pousses	5195.54	4886.60	3434.78	1245.93	308.94 (6.32)	1760.76 (51. 26)
Leaf area (cm ²) Surface foliaire (cm ²)	323.97	314.08	268.73	15.06	9.89 (3.05)	55.24 (20.56)
Leaf yield / plant (Kg) Rendement foliaire / plant (kg)	5.293	4.976	3.671	0.775	0.317 (6.37)	1.622 (44.18)

Figures in parentheses represent (%) increase / Les chiffres entre parenthèses représentent le % d'augmentation.

Each treatment was replicated seven times and the number of plants per treatment per replication was uniformly, taken as 5. In Goshwerami, sprouting of winter buds takes place in 1st week of April, (Baksh *et al.*, 1998), observations on sprouting in respect of winter buds and extent of shoot length damaged due to winter frost were taken during 4th week of April, whereas the observations on yield and growth attributes were recorded coinciding with the fifth stage of spring rearing which is the main commercial crop under Kashmir conditions. The study was repeated twice, and data was pooled.

RESULTS AND DISCUSSION

Data on various parameters – extent of sprouting in respect of winter buds, extent of damage by winter frost, fresh weight of leaf, no. of shootlets / plant, length of the longest shootlet, total shoot length per plant and leaf yield / plant is presented in Table I. As can be seen from the Table, there is an increase of 11.16% in extent of sprouting, 19.76 gm in fresh weight of 100 leaf, 22.14 in no. of shootlets per plant, 6.35 cm in length of longest shoot, 1776.60cm in total shoot length 55.24 cm² in leaf area and 1.622 Kg in case of leaf yield per plant in the plants left to senesce naturally (T1) over the plants resorted to manual leaf plucking during early Autumn (T3). On the other hand, the extent of damage by winter frost is reduced by 11% by leaving the leaf intact and senesce on its own under natural conditions.

Thus from the study it is clear that upto 30% increase in leaf yield is achieved by leaving the plants unplucked to undergo natural senescence. Further the plants appear healthier than the plants where leaf was plucked manually. This may be because the growth of the plants during the initial period, when the leaf is very small, depends on the nutrients which had got accumulated in the roots and shoots of the plants during the autumn of the previous year (Minamizawa 1984). The unplucked plants (T1) as such take a lead over the plants where leaf plucking has been resorted to during the previous autumn (T2). The effect is seen right from the very beginning i.e., sprouting of winter buds and finally gets reflected in yield and yield attributing factors. Thus from the present study it can be concluded that natural senescence is much useful to the mulberry plants as compared to autumn leaf plucking as also to the rearers.

REFERENCES

- BAKSH S., MIR M. R., KHAN M. A. & TRAG A. R. (1997). Conservation and characterization of mulberry genetic resources and its sustainable integration in temperate Agriculture System. Paper presented in international Symposium on sustainable utilization of biodiversity, organized by SAI Institute of Environment Dehradun, India and Reliable distributes, Delhi from 8-10 March. Abs. page 66.
- BAKSH S., MIR M. R., DARZI G. M. & KHAN M. A. (1998) Sprouting behaviour of winter buds, growth and moisture content in mulberry leaf during spring season in Kashmir presented in seminar on mulberry and silkworm germplasm held on 9th January at CSGRC Hosur Tamil Nadu, India.
- FOTADAR R.K. & DANDIN S.B. (1998) Preliminary screening of genotypes from the gene pool under temperate conditions. Paper presented in the seminar on mulberry and silkworm germplasm, held at CSGRC, Hosur, Tamil Nadu, India on 9-1-1998.
- KAMILI A.S., MASOODI M. A. (2000) Principles of temperate sericulture, Kalyani publishers, Ludhiana, India.
- MINAMIZAWA K. (1984) Moriculture, Science of mulberry cultivation, translated from Japanese and published by Mohan Primlani for Oxford & IBH publishing Co. New Delhi India
- MIR M. R., BAKSH S., DARZI G. M., ISA MD., KHAN M. A. (2003). Evaluation of different mulberry genotypes under rain fed conditions in Kashmir province of J&K. Paper presented in the workshop on prebreeding strategies for utilization of Sericultural germplasm resources held at CSGRC, Hosur India on 19-20, feb. pp; 12-15.

INFLUENCE DE LA SENESCENCE SUR LES PARAMETRES DE CROISSANCE ET DE RENDEMENT DU MURIER DANS DES CONDITIONS TEMPEREES

M. R. MIR, R. KOUR, ANIL DHAR, HAROON RASHID & M. A. KHAN

Central Sericultural Research & Training Institute, Pampore, J & K – 192 121, Inde.

Avant d'entrer en dormance, le mûrier comme la plupart des autres plantes, perd ses feuilles et reste inactif pendant les mois d'hiver sous les conditions climatiques du Cachemire. La cueillette manuelle des feuilles, avant le début de la sénescence, pour l'alimentation du bétail ou pour la récolte d'automne de l'élevage du ver à soie s'avère diminuer la vigueur et la capacité de rendement du mûrier le printemps suivant. On constate que si on laisse les feuilles intactes, pour qu'elles tombent naturellement et que la sénescence se produise, cela augmente la capacité de rendement des plants de mûrier jusqu'à plus de 30 %, tout en augmentant leur croissance générale et leur vigueur.

INTRODUCTION

Sous des conditions climatiques tempérées, avec une baisse de la température, le mûrier (*Morus* spp.) perd ses feuilles pendant la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine de novembre et reste en dormance pendant une période d'environ quatre mois (Baksh et coll., 1997). Les bourgeons d'hiver commencent à bourgeonner à partir de la deuxième quinzaine de mars (Baksh et coll., 1998). La taille des feuilles augmente progressivement et on en nourrit les vers à soie en mai – juin (récolte de printemps), qui est la principale récolte commerciale des fermiers. Pour cette récolte, on cueille les feuilles avec les pousses pour les larves du 5^{ème} âge pour gagner du temps, de l'espace et de la main d'œuvre et retenir l'humidité de la feuille pendant des durées comparativement plus longues (Kamili et Massoodi, 2000). On taille donc les plants en couronne et on a donc recours à une taille basale. Les bourgeons germent à nouveau et les pousses atteignent une très bonne hauteur jusqu'à la fin de septembre. Les pousses portent des feuilles très luxuriantes, qui attirent les éleveurs de bétail et les fermiers. On cueille principalement la feuille pour nourrir les moutons, les chèvres et, dans certains cas, le ver à soie pour que la deuxième récolte tombe pendant la deuxième quinzaine d'août jusqu'à la première quinzaine de septembre. Les plants qui sont soumis à une cueillette manuelle des feuilles au début de l'automne semblent plus faibles, par comparaison aux plants dont les feuilles sont laissées intactes et qu'on laisse en sénescence naturelle au moment approprié. Nous avons donc entrepris une étude pour observer le rôle de la sénescence et l'effet additif de la feuille d'automne intacte sur la croissance et le rendement du mûrier au printemps suivant.

MATERIELS ET METHODES

On entreprend l'étude au CSR&TI de Pampore, qui est situé à 30 ° 12' latitude nord et 75° 35' longitude est et 2000 m au-dessus du niveau de la mer. Là, la température descend en dessous de 0° C pendant les mois d'hiver. Le matériau pour l'étude est constitué de plants de mûrier ayant bien poussé, maintenus à taille naine dans des conditions sans irrigation. On maintient les plants d'après l'ensemble des pratiques recommandées. Le génotype choisi est Gosherami, puisqu'il est l'un des génotypes les

mieux classés, en ce qui concerne le rendement et la qualité foliaire (Fotadar et coll., 1998 ; Mir et coll., 2003). De plus, au niveau des fermiers, les plantations sont principalement constituées de ce génotype. On entreprend l'étude d'après les traitements suivants :

T1 = Plants qu'on laisse subir leur sénescence naturelle, c'est-à-dire 0 % de feuilles cueillies

T2 = Cueillette manuelle partielle des feuilles, c'est-à-dire 50 % de feuilles cueillies et 50 % qu'on laisse en sénescence

T3 = Cueillette manuelle de toutes les feuilles (100 %)

On répète chaque traitement sept fois et le nombre de plants que l'on prend uniformément par traitement et par répétition, est de 5. Chez Goshierami, le bourgeonnement des bourgeons d'hiver a lieu la première semaine d'avril (Baksh et coll., 1998), on procède aux observations sur le bourgeonnement des bourgeons d'hiver et sur la longueur des pousses abimées par le gel d'hiver au cours de la 4^{ème} semaine d'élevage, tandis qu'on enregistre les observations sur les attributs de rendement et de croissance, pendant l'élevage des vers à soie de printemps du cinquième âge, qui est la principale récolte commerciale dans les conditions du Cachemire. On répète l'étude deux fois et on regroupe les données.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur les paramètres variés, le degré de germination des bourgeons d'hiver, l'étendue des dégâts provoqués par le gel d'hiver, le poids de la feuille fraîche, le nombre de pousses / plant, la longueur du rameau le plus long, la longueur totale de la pousse par plant et le rendement foliaire / plant sont présentées dans le Tableau I. Comme on peut le constater d'après le Tableau, il y a une augmentation de 11,16 % du degré de germination, un poids frais de 100 feuilles de 19,76 g, un nombre de rameaux par plant de 22,14, une longueur de 6,35 cm de la pousse la plus longue, une longueur totale de pousses de 1776,60 cm, une surface foliaire de 55,24 cm² et un rendement foliaire par plant de 1 622 kg chez les plants qui subissent la sénescence naturelle (T1). D'autre part, l'étendue des dégâts provoqués par le gel baisse de 11 %, lorsqu'on laisse les feuilles intactes et subir leur sénescence dans des conditions naturelles.

D'après cette étude, il est donc clair qu'on peut atteindre une augmentation du rendement jusqu'à 30 %, en laissant la sénescence naturelle se produire. De plus, les plants semblent plus sains que ceux dont on cueille la feuille manuellement. Cela pourrait être dû au fait que, pendant la période initiale, quand la feuille est très petite, la croissance des plants dépend des nutriments qui se sont accumulés dans les racines et dans les pousses des plants au cours de l'automne précédent (Minamizawa, 1984). En tant que tels, les plants non cueillis (T1), passent en tête devant les autres plants, dont on a cueilli les feuilles au cours de l'automne précédent (T2). On en voit l'effet, dès le tout début, c'est-à-dire dans la germination des bourgeons d'hiver, qui finit par se refléter dans le rendement et dans les facteurs attribués au rendement. D'après cette étude, on peut donc conclure que la sénescence naturelle est très utile pour les plants de mûrier ainsi que pour les fermiers, par comparaison à la cueillette des feuilles en automne.

PREDICTION OF LEAF RUST DISEASE IN MULBERRY FOR TIMELY MANAGEMENT

**V. NISHITHA NAIK, D. D. SHARMA, V. R. MALA, M. REKHA, GOVINDAIAH¹ &
V. P. GUPTA²**

Central Sericulture Research and Training Institute, Mysore - 570 008, India.

1. Department of studies in Sericulture, University of Bangalore, Bangalore - 560 056, India.

2. Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi, India.

*Among the foliar diseases of mulberry, leaf rust (*Cerotelium fici*) is a most serious disease causing leaf yield loss more than 12 %, besides deteriorating the leaf quality. Epidemiological factors play a greater role in host-pathogen interactions, disease expression and disease progress. An experiment was undertaken with seven promising mulberry varieties (Local, K-2, S-13, S-34, S-36, V-1 and MR-2) under natural conditions for 3 consecutive years to find out the crucial environmental factors responsible for disease out-break. Data were recorded at 5 days interval starting from 30 days to 70th Day After Pruning (DAP) during rainy, winter and summer seasons. Leaf rust starts progressing on 45th DAP and becomes very severe on 70th DAP. Analysis of pooled data of three years revealed that the severity of leaf rust was negligible during summer (0.26-4.94) and maximum (0.59-30.94 %) in rainy followed by winter season (0.38-28.90 %). The severity of rust (Percent Disease Index; PDI) ranged from 22.11 - 30.94 % in all the tested varieties on 70th DAP during rainy and winter seasons. All the tested varieties were found susceptible to the leaf rust disease. Data on disease severity so obtained were correlated with weather parameters like temperature, relative humidity, rainfall and sunshine through correlation and multiple step-down regression analysis. Results revealed that DAP (45-70) and average relative humidity (68.9 – 84.4 %) were positively correlated with the disease development and double variable equation was derived for prediction of rust disease. Based on the results, it is suggested that during rainy and winter seasons preventive measures for leaf rust should be initiated before 50th DAP.*

Keywords: Prediction, leaf rust, mulberry, step-down regression analysis.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* spp.), the sole food plant of silkworm (*Bombyx mori* L.) is affected by various foliar diseases viz., leaf spot [*Cercospora moricola* (Cooke) Sacc.], powdery mildew [*Phyllactinia corylea* (Pers) Karst], leaf rust [*Cerotelium fici* (Cast) Arth.], Leaf blight [*Alternaria alternata* (Fr. Keisaster) or *Fusarium pallidoroseum*], and bacterial blight [*Pseudomonas syringae* pv. *mori* (Boyer & Lambert) Stevens/ *Xanthomonas campestris* pv. *mori* (Pommel) Dowson] (Sharma, 2004). Among all, leaf rust is one of the most destructive disease in India and spreads very fast after the onset of monsoon. The disease causes more than 12 % leaf yield loss and diseased leaves contain low moisture, crude protein and sugar content (Sundareswaran *et al.*, 1988; Sengupta *et al.*, 1990; Govindaiah and Gupta, 2005). The disease appears as numerous pin-head sized circular to oval brownish black eruptive lesions on the leaf surface, leading to yellowing resulting in premature leaf-fall. The causal pathogen is an obligate parasite and micro cyclic rust (Sharma, 2004). Epidemics of rust are greatly influenced by cultivation practices, soil conditions, age of the crop and environmental factors (Sharma

et al., 1996; Sukumar and Padma, 1999; Sharma, 2004). Fungicide like Kavach (Chlorothalonil 75% WP) has been recommended for the control of leaf rust disease (Sharma, 2004).

Feeding the silkworm with rust affected leaves affects the commercial characters of the cocoons (Kumar *et al.*, 1993). Hence, the analysis of the rust epidemics a week before the actual appearance through mathematical model helps to predict the disease for timely management of the disease. Various workers have developed prediction models for the rust epidemics viz., linear prediction, first order auto regression, logistic, *etc.* in crops like wheat, groundnut, sun flower, *etc.* (Bulbule *et al.*, 1989; 1996; Amaresh and Nargund, 2004). Such models are not available in mulberry and the study was taken up to predict the epidemics of rust in promising mulberry varieties using mathematical model for timely control measures to prevent the leaf yield loss.

MATERIALS AND METHODS

A field experiment was taken up at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore in Randomized Block Design with seven promising mulberry varieties viz., Local, K-2, S-13, S-34, S-36, V-1 and MR-2 under natural condition in three replications during 2000 – 2002. A total of 105 sub-plots, each having 10 sq. m. gross size with 25 plants, at 60 × 60 cm spacing were maintained throughout the experimental period. Highly susceptible variety ACC-202 was planted around the micro plots as infector rows to build up the disease inoculum (Philip *et al.*, 1996). The plots were maintained as per the recommended agronomical package (Dandin *et al.*, 2003). Data on disease severity and development were recorded at 5 days intervals starting from the 35th day after pruning (DAP) till the entire crop period (70th day) in 10 randomly selected plants/variety/replication. Total number of leaves and leaves infected with rust disease were counted. Infected leaves were categorized in 0-5 scale (Sharma and Gupta, 2005) and the severity of disease (Percent Disease Index - PDI) was calculated by using formula as suggested by Mc Kinney (1923).

Grading Scale (0-5):

0 :	No Infection
1 :	0 - 5% leaf lamina covered by the symptoms
2 :	6 - 25% leaf lamina covered by the symptoms
3 :	26 - 50% leaf lamina covered by the symptoms
4 :	51 - 75% leaf lamina covered by the symptoms
5 :	76 - 100% leaf lamina covered by the symptoms

$$PDI = \frac{\text{Sum of numerical values}}{\text{Total no. of leaves} \times \text{Maximum grading (i.e. 5)}} \times 100$$

Degree of disease resistance/susceptibility in mulberry varieties was assessed on the basis of PDI and classified into following categories (Sharma and Gupta, 2005).

0	PDI - Immune/completely resistant
0 - 5.0	PDI - Resistant
5.1 - 20.0	PDI - Moderately resistant
20.1 - 50.0	PDI - Susceptible
50.1 - 100	PDI - Highly susceptible

The weather parameters like temperature (° C), relative humidity (%), sunshine period (total hours/day) and cumulative rain fall (mm) were recorded at weather station of CSRTI, Mysore throughout the period of experiment. Data on PDI, crop age and meteorological parameters were subjected to correlation and step-down regression analysis. Best-fitted prediction equation was then evaluated based on the prediction value (Coefficient of determination or R^2 value) of the equation.

RESULTS AND DISCUSSION

Average data of three years (2000-2002) covering all the seasons on development and severity of leaf rust disease revealed that the outbreak of rust was not observed on 35th to 40th DAP in all the seasons while on 45th DAP the disease severity (PDI) ranged from 0.47 - 3.27 % in different varieties and gradually increased on 50th DAP (5.12 – 6.93 %) and ranged from 22.11 - 30.94 % on 70th DAP during rainy and winter seasons while in summer season the severity of rust ranged from 0.26 - 4.94 % (45th – 70th DAP). These observations suggest that the disease starts progressing on 45th DAP and becomes very severe on 70th DAP during rainy and winter seasons. The results are in conformity with the findings of Sengupta *et al.* (1990) who reported that matured mulberry leaves are affected by leaf rust disease in rainy and winter seasons.

With respect to the level of resistance/susceptibility of varieties, all the tested varieties were found susceptible to leaf rust (22.11 – 30.94 % on 70th DAP) during rainy and winter seasons (Table I). Several workers have reported differential reaction of mulberry genotypes/varieties against leaf rust. Varieties like K-2, MR-2 and S-36 exhibited a susceptible reaction (Boraiah *et al.*, 1987; Govindaiah *et al.*, 1989; Philip *et al.*, 1994; Sharma, 2004). The severity of rust increased from 5.12 – 6.93 % on 50th DAP (Table-I), which strongly suggests for need based control measure before 50th DAP to avoid the rust appearance and its epidemics during rainy and winter seasons as the ETL is crossed (Naik *et al.*, 2003).

Step-down regression analysis of crop age and meteorological parameters (maximum temperature, minimum temperature, maximum relative humidity, cumulative rain fall and sunshine) with severity of leaf rust indicated that crop age and average relative humidity exhibited a strong positive correlation with disease severity during rainy and winter seasons. The average weekly relative humidity ranging from 68.9 – 84.4 % and crop age 45th – 70th DAP favoured the disease development significantly. The other meteorological factors exhibited varied reactions with disease severity (Table-II). Though the temperature, cumulative rain fall and sunshine were also found associated as dependent characters for favouring the disease development, in most of the cases the relationship was either weak or negatively correlated. Hence, the double variable equation with crop age and average relative humidity has been considered for better prediction of leaf rust disease severity.

The final prediction equation for different mulberry varieties during rainy and winter seasons was derived as follows.

$$\text{Prediction of leaf rust (\%)} = -66.18 + 0.80^{**} (\text{DAP}) + 0.45^{*} (\text{AH}) \text{ with } R^2 \text{ value of } 0.95$$

where **DAP**: Days after pruning (favourable range 45-70); **AH** : Average humidity (favourable range 68.9 - 84.4 %).

Correlation and Regression analysis indicated that the crop age and average relative humidity were found to be significant contributing factors for progress of leaf rust. The maximum severity of leaf rust during rainy and winter seasons can be attributed to the conducive environment prevalent for disease development. The advanced age of the crop and relative humidity during rainy and winter seasons influence the liberation and dispersal of rust spores into the atmosphere thus infecting the new plants and hence the disease becomes more severe during rainy and winter seasons by successive generations of pathogens. Similar observations were also made for outbreak and severity of leaf spot caused by *Cercospora moricola* in mulberry (Srikantaswamy *et al.*, 2000). Sharma *et al.* (1996) have also reported that high relative humidity (70 -80%) is ideal for development of leaf rust disease in mulberry. In Karnataka, the development of leaf rust related to crop age and relative humidity in groundnut caused by *Puccinia arachidis* has been reported (Krishnaprasad *et al.*, 1979).

Table I. Seasonwise data on severity (PDI) of leaf rust disease in different mulberry varieties (45-70th DAP).

Tableau I. Données en fonction des saisons sur la sévérité de la maladie de la rouille de la feuille (PDI) chez les différentes variétés de mûrier (45^{ème} à 70^{ème} jour après la taille).

Variety	Severity of leaf rust (Percentage of Disease Index - PDI)												
Variété	Sévérité de la rouille de la feuille (Pourcentage d'Indice de la maladie – PDI)												
DAP	Rainy Season			Avg	Winter Season			Avg	Summer Season			Avg	
	Saison des Pluies			Moyenne	Saison d'hiver			Moyenne	Saison d'été			Moyenne	
	2000	2001	2002		2000	2001	2002		2000	2001	2002		
Local	45	3.45	2.37	4.01	3.27	1.81	2.37	2.10	2.09	0.22	0.51	0.75	0.49
	50	7.06	6.39	7.36	6.93	6.14	5.60	5.38	5.70	1.12	1.75	1.92	1.59
	55	10.02	9.11	10.50	9.87	10.11	9.36	9.10	9.52	2.10	2.21	2.81	2.37
	60	13.06	11.08	12.75	12.29	14.59	15.36	12.10	14.01	3.2	3.00	4.22	3.47
	65	19.71	16.57	17.52	17.9	18.82	22.27	16.51	19.2	4.01	3.12	5.17	4.10
	70	23.40	20.22	22.72	22.11	24.83	33.73	22.18	26.91	4.86	3.81	5.98	4.88
K-2	45	2.35	1.36	2.38	2.03	0.75	0.98	1.02	0.91	0.41	0.75	0.25	0.47
	50	5.45	5.36	4.57	5.12	4.82	5.52	5.08	5.14	1.22	1.72	1.00	1.31
	55	11.50	7.59	10.86	9.98	4.01	5.76	5.75	5.17	2.06	2.56	2.51	2.37
	60	17.26	12.64	14.47	14.79	8.57	18.94	10.25	12.58	3.52	3.10	3.46	3.36
	65	23.15	18.75	20.71	20.87	14.51	25.16	17.26	18.97	4.80	4.00	5.21	4.67
	70	38.87	25.93	28.04	30.94	28.79	36.59	21.33	28.90	4.93	4.10	5.78	4.93
S-13	45	1.05	0.49	0.24	0.59	0.58	0.75	0.12	0.48	0.79	0.80	0.04	0.54
	50	5.56	4.15	6.37	5.36	5.75	5.03	5.37	5.38	1.61	2.00	0.22	1.27
	55	7.09	8.72	8.79	8.2	4.12	6.39	7.32	5.94	2.44	2.58	1.15	2.05
	60	14.45	12.62	13.89	13.65	9.52	15.78	12.15	12.48	3.15	3.26	2.01	2.80
	65	26.31	18.55	18.70	21.18	15.75	22.57	15.24	17.85	4.12	5.12	2.75	3.99
	70	29.93	24.50	26.21	26.88	24.4	36.15	18.27	26.27	5.28	6.15	3.10	4.84
S-34	45	2.91	1.37	1.62	1.96	1.23	1.17	1.07	1.15	0.61	0.64	0.21	0.48
	50	6.63	4.52	5.43	5.52	5.41	5.60	4.86	5.29	1.19	1.25	0.65	1.03
	55	12.21	8.13	7.68	9.34	9.93	8.75	8.91	9.19	2.14	2.52	2.51	2.39
	60	15.02	12.57	14.52	14.03	12.41	15.25	12.56	13.40	3.75	3.25	3.54	3.51
	65	22.15	18.76	19.57	20.16	17.19	24.10	18.12	19.80	4.16	4.16	5.26	4.52
	70	30.73	25.76	29.79	28.76	28.21	33.37	24.36	28.64	4.37	4.71	5.75	4.94

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

Variety	Severity of leaf rust (Percentage of Disease Index - PDI)												
Variété	Sévérité de la rouille de la feuille (Pourcentage d'Indice de la maladie - PDI)												
DAP	Rainy Season			Avg	Winter Season			Avg	Summer Season			Avg	
	Saison des Pluies			Moyenne	Saison d'hiver			Moyenne	Saison d'été			Moyenne	
	2000	2001	2002		2000	2001	2002		2000	2001	2002		
S-36	45	3.29	1.85	1.21	2.11	1.48	0.38	1.38	1.08	0.32	0.54	0.08	0.31
	50	6.44	5.32	4.40	5.38	5.76	5.63	5.50	5.63	1.47	1.68	1.21	1.45
	55	12.23	8.07	8.01	9.43	10.6	9.65	8.15	9.46	2.42	2.30	2.50	2.40
	60	22.36	15.21	12.22	16.59	15.27	18.25	12.56	15.36	3.43	3.05	3.00	3.16
	65	29.51	18.29	18.26	22.02	20.97	28.01	17.55	22.17	4.01	3.80	3.70	3.83
	70	34.25	23.97	26.99	28.40	25.73	36.18	20.08	27.33	5.01	4.66	4.02	4.56
V-1	45	2.07	0.73	1.21	1.33	0.86	0.05	0.24	0.38	0.42	0.51	0.04	0.32
	50	6.51	5.93	4.40	5.61	5.28	5.63	5.25	5.38	0.71	1.00	1.18	0.96
	55	14.52	9.15	8.01	10.56	9.03	8.31	8.56	8.63	1.52	1.95	2.00	1.82
	60	20.15	15.12	12.22	13.67	12.35	15.12	11.52	12.99	2.05	2.5	2.40	2.31
	65	28.32	18.15	20.56	22.34	17.52	24.15	15.21	18.96	2.75	3.00	2.90	2.88
	70	33.30	23.49	26.92	27.90	20.52	31.89	19.01	23.80	3.26	3.33	3.28	3.29
MR-2	45	1.78	0.38	0.41	0.85	1.55	2.55	0.02	1.37	0.52	0.20	0.08	0.26
	50	4.40	6.51	5.35	5.42	5.57	6.30	5.00	5.62	1.54	0.65	0.55	0.91
	55	10.03	6.85	6.05	7.64	6.86	12.51	7.61	8.99	2.18	1.02	1.52	1.57
	60	13.56	12.04	11.36	12.32	13.56	19.21	9.25	14.00	3.02	1.72	2.15	2.29
	65	20.50	16.52	18.72	18.58	15.75	26.17	13.57	18.49	3.90	2.00	2.57	2.82
	70	27.86	24.01	26.60	26.15	21.58	29.94	20.97	24.16	4.23	3.00	3.02	3.42

Table II. Correlation coefficients of crop age and meteorological parameters on severity of leaf rust disease.*Tableau II. Coefficients de corrélation entre l'âge de la culture, les paramètres météorologiques et la sévérité de la maladie de la rouille de la feuille.*

Variables	Rainy season			Winter season			Pooled (Rainy)	Pooled (Winter)
	<i>Saison des pluies</i>			<i>Saison d'hiver</i>			<i>Ensemble (Saison des pluies)</i>	<i>Ensemble (Hiver)</i>
	2000	2001	2002	2000	2001	2002		
CROP AGE	0.90**	0.91**	0.91**	0.86**	0.87**	0.90**	0.90**	0.87**
<i>Age de la culture</i>								
MAXT	0.54	0.81*	-0.69	0.85*	-0.33	0.13	0.13	0.31
MNT	0.67	0.04	-0.47	0.45	-0.76*	0.41	0.08	0.70
AVT	0.60	-0.12	-0.73*	0.88**	-0.33	-0.39	0.00	0.23
MAXRH	0.83*	0.80*	0.70	0.56	0.53	0.64	0.80*	0.63
MNRH	0.63	0.56	0.55	0.58	0.45	0.43	0.53	0.47
AVRH	0.93**	0.82**	0.86**	0.84**	0.72*	0.79**	0.85**	0.77**
CRF	-0.28	0.59	0.61	0.24	-0.01	-0.60	-0.01	-0.11
SS	0.48	0.56	-0.43	-0.47	0.61	0.39	0.19	0.22

* Significant at $P = 0.05$ / *Significatif au seuil de $P = 0,05$* ; ** Significant at $P = 0.01$ / *Significatif au seuil de $P = 0,01$* .

MAXT: Maximum temperature / *Température maximum*, MNT: Minimum temperature / *Température minimum*, AVT: Average temperature / *Température moyenne*, MAXRH: Maximum relative humidity / *Humidité relative maximum*, MNRH: Minimum relative humidity / *Humidité relative minimum*, AVRH: Average relative humidity / *Humidité relative moyenne*, CRF: Cumulative rainfall / *Précipitations cumulées*, SS: Sunshine / *Ensoleillement*.

Rust epidemics has been reported in several crops with various models like logistic model (Vanderplank, 1963) and linear prediction model (Bulbule *et al.*, 1989) in relation to bio-meteorological factors. First order auto regression model has been developed by Nargund (1989) and Benagi (1995) for leaf rust of wheat and leaf spot of groundnut, respectively. In mulberry, the step-down regression model was found to be the best-fitted model for prediction of leaf rust disease.

The present study suggests that severity of leaf rust disease in mulberry can be predicted based on the crop age and average relative humidity. The disease severity can be forewarned if the concomitant variables are known. It is also necessary to take up recommended control measures before 50th DAP for effective control of the disease and avoiding leaf yield loss.

REFERENCES

- AMARESH, Y. S. & NARGUND, V. B. (2004) Comparison of the mathematical models to predict the *Alternaria* leaf blight of sunflower. J. Mycol. Pl. Pathol., 34: 60-63.
- BENAGI, V. I. (1995) Epidemiology and management of late leaf spot of groundnut caused by *Phaeosariopsis personata* (Berk. & Curt.) V. Arx. Ph. D. Thesis. University of agricultural Sciences, Dharwad, pp. 207.
- BORAIAH, G., SHREE, M. P. & NARAYANA GOWDA, S. N. (1987) Screening of mulberry plants for foliar diseases in the germplasm bank. Sericologia, 27: 165-176.
- BULBULE, S. V., SANDHIKAR, R. N. & MAYEE, C. D. (1989) A linear prediction equation for forecasting groundnut rust. Indian Phytopath., 42: 347.
- BULBULE, S. V., MAYEE, C. D. & SANDHIKAR, R. N. (1996) Disease prediction models in groundnut rust epidemics. Indian J. Mycol. Pl. Pathol., 45: 45-49.
- DANDIN, S. B., JAYASWAL, J. & GIRIDHAR, K. (2003) Hand Book of Sericulture Technologies. Central Silk Board, Bangalore, India, pp. 11-87.
- GOVINDAIAH, SHARMA, D. D., SENGUPTA, K., GUNASHEKHAR, V. SURYANARAYANA, N. & MADHAVA RAO, Y. R. (1989) Screening of mulberry varieties against major fungal diseases. Indian J. seric. 28: 207-213.
- GOVINDAIAH & GUPTA, V. P. (2005) Foliar diseases of mulberry and their management. In: A Text Book on Mulberry Crop Protection. Govindaiah, Gupta, V. P., Sharma, D. D., Rajadurai, S. & Naik, V. N. (Eds.), Central silk Board (Ministry of Textiles- Government of India) Madivala, Bangalore, India, pp.145-177.
- KRISHNAPRASAD, K.S., SIDDARAMAIAH, A. L. & HEGDE, R. K. (1979) Development of peanut (groundnut) rust disease in Karnataka state, India. Plant Disease. Reprtr. 63: 692-695.
- KUMAR, N. N. U., SHARMA, D. D. & SHREE, M. P. (1993) Effect of feeding fungi infected mulberry leaves on the commercial characters of silkworm (*Bombyx mori* L.). Indian J. Seric., 32:107-109.
- MC KINNEY, H. H. (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Heminthosporium sativum*. J. Agr. Res., 26: 195-210.
- NAIK, V. N., MALA, V. R. & GUPTA, V. P. (2003) Epidemiology and disease development in promising mulberry genotypes for the effective management of leaf spot and leaf rust diseases. In: Annual report (2003-04). Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, pp. 39-40.
- NARGUND, V. B. (1989) Epidemiology and control of leaf rust of wheat caused by *Puccinia recondite* f. sp. tritici Rob. Ex. Desm. Ph. D. Thesis. University of Agricultural Sciences, Dharwad, pp. 337.
- PHILIP, T., GOVINDAIAH & DATTA, R. K. (1994) Sources of resistance in mulberry to leaf rust. Indian Phytopath., 47: 201-202.
- PHILIP, T., SARKAR, A. & GOVINDAIAH (1996) Screening of some promising genotypes of mulberry for leaf spot and rust resistance. Indian J. Seric., 35: 158-159.
- SENGUPTA, K., KUMAR, P., BAIG, M. & GOVINDAIAH (1990) Hand book on Pest and Disease Control of Mulberry and Silkworm. United Nations, Economic and Social Commission for Asia and Pacific, Bangkok, Thailand, pp. 3-15.
- SHARMA, D. D., GOVINDAIAH, GHOSH, A., PHILIP, T., AMBIKA, P. K. & CHOUDHARY, P. C. (1996) Effect of seasons, spacings, host genotypes and fertilizers doses on the incidence of major foliar diseases of mulberry. Indian J. Seric., 35: 57-61.
- SHARMA, D. D. (2004) Foliar diseases of mulberry and their management – LEAD PAPER. In: Advances in disease and pest management in sericulture. Govindan, R., Ramakrishna Naika & Sannappa, B. (Eds.), Seri Scientific Publishers, Bangalore. pp. 1-21.
- SHARMA, D. D. & GUPTA, V. P. (2005) Methods and calculation of disease scoring in mulberry. In: A text Book on Mulberry Crop Protection. Govindaiah, Gupta, V. P., Sharma, D. D., Rajadurai, S. & Nishitha Naik, V. (Eds.), Central Silk Board (Ministry of Textiles-Government of India) Madivala, Bangalore, India, pp. 23-36.

- SRIKANTASWAMY, K., GUPTA, V. P., RAVEESHA, K. A. & REKHA, M. (2000) Influence of epidemiological factors on development of leaf spot disease in mulberry caused by *Cercospora moricola*. *Pestology*, 24: 18-27.
- SUNDARESWARAN, P., GOVINDAIAH, SRINIVASAN, E. B. & JOLLY, M. S. (1988) Effect of leaf rust disease on the nutritive composition of mulberry (*Morus alba* L.). *Indian J. Seric.*, 27: 159-160.
- SUKUMAR, J. & PADMA, S. D. (1999) Diseases of mulberry in India – Research progress and priorities. In: *Advances in mulberry sericulture*. Devaiah, M. C., Narayanaswamy, V. G & Maribashetty (Eds.), C.V.G. Publications, Bangalore, India, pp.152-186.
- VANDERPLANK, J. E. (1963) *Plant diseases: Epidemics and control*. Academic Press, New York, p. 349.

PREDICTION DE LA MALADIE DE LA ROUILLE DE LA FEUILLE CHEZ LE MURIER POUR UNE GESTION PRECOCE

V. NISHITA NAIK, D. D. SHARMA, V. R. MALA, M. REKHA, GOVINDAIAH¹ &
V. P. GUPTA²

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

1. Department of Studies in Sericulture, University of Bangalore, Bangalore – 560 056, Inde.

2. Central Tasar Research and Training, Ranchi, Inde.

Parmi les maladies foliaires du mûrier, la rouille de la feuille (*Cerotelium fici*) est une maladie très sévère, qui entraîne une perte de rendement foliaire de plus de 12 %, tout en détériorant la qualité de la feuille. Les facteurs épidémiologiques jouent un rôle principal dans les interactions hôte - pathogène, l'expression de la maladie et la progression de la maladie. Nous avons entrepris une expérience avec sept variétés de mûrier prometteuses (Local, K-2, S-13, S-34, S-36, V-1 et MR-2) dans des conditions naturelles pendant 3 années consécutives, pour élucider les facteurs environnementaux cruciaux par rapport à l'éruption de la maladie. On enregistre les données à 5 jours d'intervalle, de 30 à 70 jours après la taille (DAP), pendant les saisons des pluies, d'hiver, et de l'été. La rouille de la feuille commence à progresser à partir du 45^{ème} jour après la taille et devient très sévère le 70^{ème} jour après la taille. L'analyse des données regroupées pour trois années révèle que, la sévérité de la rouille de la feuille est négligeable en été (0,26 à 4,94) et maximum (0,59 à 30,94 %) pendant la saison des pluies, suivie par la saison de l'hiver (0,38 à 28,90 %). La sévérité de la rouille (Indice de Pourcentage de Maladie : PDI) est comprise entre 22,11 et 30,94 %, chez toutes les variétés testées le 70^{ème} jour après la taille pendant les saisons des pluies et de l'hiver. Toutes les variétés testées s'avèrent sensibles à la maladie de la rouille de la feuille. Les données sur la sévérité de la maladie obtenues de la sorte, sont corrélées avec les paramètres météorologiques, comme la température, l'humidité relative, les précipitations et le soleil par l'intermédiaire de l'analyse de corrélation et de régression multiple. Les résultats révèlent que le jour après la taille (45^{ème} à 70^{ème}) et l'humidité relative moyenne (68,9 à 84,4 %) sont corrélés de manière positive avec le développement de la maladie et on met au point l'équation à double variable pour prédire la maladie de la rouille. D'après les résultats, on suggère que pendant les saisons des pluies et de l'hiver, il faut démarrer les mesures préventives contre la rouille de la feuille avant le 50^{ème} jour après la taille.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* spp.), la seule plante hôte du ver à soie (*Bombyx mori* L.), est affecté par des maladies foliaires variées, comme la tache de la feuille [*Cercospora moricola* (Cooke) Sacc.], le mildiou poudreux [*Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst], la rouille de la feuille [*Cerotelium fici* (Cast) Arth.], la flétrissure de la feuille [*Alternaria alternata* (Fr. Keisaster) ou *Fusarium pallidoroseum*] et la flétrissure bactérienne [*Pseudomonas syringae* pv. *mori* (Boyer & Lambert) Stevens / *Xanthomonas campestris* pv. *mori* (Pommel) Dowson] (Sharma, 2004). Parmi toutes ces maladies, la rouille de la feuille est l'une des maladies les plus destructrices en Inde et elle se propage très rapidement après le début de la mousson. La maladie provoque plus de 12 % de perte de rendement foliaire et les feuilles malades contiennent peu d'eau, de protéines brutes et de sucres (Sundareswaran et coll., 1988 ;

Sengupta et coll., 1990 ; Govindaiah et Gupta, 2005). La maladie apparaît sous la forme de nombreuses lésions éruptives circulaires marron-noir, de la taille d'une tête d'épingle sur la surface de la feuille, qui entraînent un jaunissement, qui provoque la chute prématurée de la feuille. Le pathogène responsable est un pathogène obligé et une rouille microcyclique (Sharma, 2004). Les épidémies de rouille sont très influencées par les pratiques culturales, les conditions du sol, l'âge de la culture et les facteurs environnementaux (Sharma et coll., 1996 ; Sukumar et Padma, 1999 ; Sharma, 2004). On a recommandé un fongicide comme le Kavach (Chlorothalonil 75 % WP) pour lutter contre la maladie de la rouille de la feuille (Sharma, 2004).

L'alimentation du ver à soie avec des feuilles atteintes par la rouille affecte les caractères commerciaux des cocons (Kumar et coll., 1993). L'analyse de l'épidémie de la rouille une semaine avant l'apparition réelle grâce à un modèle mathématique peut aider à prévoir la maladie, pour une gestion précoce de la maladie. Plusieurs chercheurs ont mis au point des modèles de prédiction de l'épidémie de rouille, telles que la prédiction linéaire, l'auto régression, la logistique, chez des cultures comme le blé, l'arachide, le tournesol, etc... (Bulbule et coll., 1989 ; 1996 ; Amaresh et Nargund, 2004). De tels modèles ne sont pas disponibles chez le mûrier et nous avons entrepris cette étude pour prédire l'épidémie de rouille chez des variétés de mûrier prometteuses, en utilisant un modèle mathématique pour des mesures de lutte précoces pour prévenir la perte de rendement foliaire.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons entrepris une expérience sur le terrain au *Central Sericultural Research and Training Institute*, à Mysore, selon une Conception Aléatoire en Blocs, avec sept variétés de mûrier prometteuses, c'est-à-dire Local, K-2, S-13, S-34, S-36, V-1 et MR-2 dans des conditions naturelles en trois répétitions, de 2000 à 2002. On maintient un ensemble de 105 sous-parcelles, chacune de 10 m² avec 25 plants et un espacement de 60 × 60 cm pendant la période de l'expérience. On plante la variété très sensible ACC-202 autour des micro-parcelles comme rangées infestatrices pour augmenter l'inoculum de la maladie (Philip et coll., 1996). On maintient les parcelles d'après le système agronomique recommandé (Dandin et coll., 2003). On enregistre les données sur la sévérité et le développement de la maladie, à 5 jours d'intervalle, à partir du 35^{ème} jour après la taille jusqu'à la fin de la période de culture (70^{ème} jour) chez 10 plants / variété / répétition, sélectionnés au hasard. On compte le nombre total de feuilles et de feuilles infestées par la maladie de la rouille. On classe les feuilles infestées selon une échelle de 0 à 5 (Sharma et Gupta, 2005) et on calcule la sévérité de la maladie en utilisant la formule suggérée par Mc Kinney (1923).

Echelle de notation (0 à 5) :

0 :	Pas d'infestation
1 :	0 à 5 % de limbe foliaire recouvert par les symptômes
2 :	6 à 25 % de limbe foliaire recouvert par les symptômes
3 :	26 à 50 % de limbe foliaire recouvert par les symptômes
4 :	51 à 75 % de limbe foliaire recouvert par les symptômes
5 :	76 à 100 % de limbe foliaire recouvert par les symptômes

$$PDI = \frac{\text{Somme des valeurs numériques}}{\text{Nbre total de feuilles} \times \text{Notation maximum (c'est à dire 5)}} \times 100$$

On évalue le degré de résistance /de sensibilité à la maladie chez les variétés de mûrier, sur la base du PDI, et on les classe dans les catégories suivantes (Sharma et Gupta, 2005).

0	PDI Immunisé / résistance complète
0- 5,0	PDI – Résistant
5,1 – 20,0	PDI – Modérément résistant
20,1- 50,0	PDI – Sensible
50,1- 100	PDI – Très sensible

On enregistre les paramètres météorologiques comme la température (° C), l'humidité relative (%), la période d'ensoleillement (total d'heures / jour) et les précipitations cumulées (mm) à la Station Météorologique du CSRTI, de Mysore, pendant toute la durée de l'expérience. On soumet les données sur le PDI, l'âge de la culture et les paramètres météorologiques à l'analyse de corrélation et de régression. Puis, on procède à l'évaluation de l'équation de prédiction la plus appropriée, d'après la valeur de prédiction (coefficient de détermination de la valeur R^2) de l'équation.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données moyennes pour trois années (2000 – 2002) couvrant toutes les saisons sur le développement et la sévérité de la maladie de la rouille de la feuille révèlent qu'on n'observe pas d'éruption de rouille du 35^{ème} au 40^{ème} jour après la taille pendant toutes les saisons, tandis que le 45^{ème} jour après la taille, la sévérité de la maladie (PDI) est comprise entre 0,47 et 3,27 % chez les différentes variétés et augmente progressivement le 50^{ème} jour après la taille (5,12 à 6,93 %) et est comprise entre 22,11 et 30,94 % le 70^{ème} jour après la taille pendant les saisons des pluies et de l'hiver, tandis que pendant l'été la sévérité de la rouille est comprise entre 0,25 et 4,94 % (45^{ème} à 70^{ème} jour après la taille). Ces observations suggèrent que la maladie commence à progresser à partir du 45^{ème} jour après la taille et devient très sévère le 70^{ème} jour après la taille pendant les saisons des pluies et de l'hiver. Ces résultats sont conformes à ceux de Sengupta et coll., (1990) qui ont rapporté que les feuilles de mûrier matures sont affectées par la maladie de la rouille de la feuille pendant les saisons des pluies et de l'hiver.

En ce qui concerne le niveau de résistance / de sensibilité des variétés, toutes les variétés testées s'avèrent sensibles à la rouille de la feuille (22,11 à 30,94 % le 70^{ème} jour après la taille) pendant les saisons des pluies et de l'hiver (Tableau I). Plusieurs chercheurs ont rapporté une réaction différentielle des génotypes / des variétés de mûrier contre la rouille de la feuille. Les variétés comme K2, MR-2 et S-36 présentent une réaction sensible (Boraiah et coll., 1987 ; Govindaiah et coll., 1989 ; Philip et coll., 1994 ; Sharma, 2004). La sévérité de la rouille augmente de 5,12 à 6,93 % le 50^{ème} jour après la taille (Tableau I), ce qui suggère qu'il est nécessaire d'avoir recours à des mesures de lutte en fonction des besoins avant le 50^{ème} jour après la taille pour éviter l'apparition de la rouille et son épidémie pendant les saisons des pluies et de l'hiver quand son ETL est croisée (Naik et coll., 2003).

L'analyse de régression entre l'âge de la culture et les paramètres météorologiques (température maximum, température minimum, humidité relative maximum, précipitations cumulatives et ensoleillement) avec la sévérité de la rouille de la feuille indique que l'âge de la culture et l'humidité relative moyenne présentent une forte corrélation positive avec la sévérité de la maladie pendant les saisons d'hiver et des pluies. L'humidité relative hebdomadaire moyenne, comprise entre 68,9 et 84,4 % et l'âge de la culture, 45 à 70 jours après la taille, favorisent considérablement le développement de la maladie. Les autres facteurs météorologiques présentent des réactions variées avec la sévérité de la maladie (Tableau II). Bien que la température, les précipitations cumulées et l'ensoleillement soient aussi associés comme caractères dépendants en contribuant au développement de la maladie, dans la plupart des cas, la relation est soit faible ou négativement corrélée. Nous avons donc pris en compte l'équation à double variable avec l'âge de la culture et l'humidité relative moyenne pour mieux prédire la sévérité de la rouille de la feuille.

On en a déduit l'équation de prédiction finale pour les différentes variétés de mûrier pendant les saisons des pluies et de l'hiver :

Prédiction de la rouille de la feuille = $-66,18 + 0,80^{**} (\text{DAP}) + 0,45^{*} (\text{AH})$ avec la valeur R^2 de 0,95

Où **DAP** : Jours après la taille (fourchette favorable 45 à 70) ; **AH** : Humidité relative (fourchette favorable 68,9 à 84,4 %)

L'analyse de corrélation et de régression indique que l'âge de la culture et l'humidité relative moyenne s'avèrent être des facteurs contributeurs significatifs pour la progression de la rouille de la feuille. On peut attribuer la sévérité maximum de la rouille de la feuille pendant les saisons des pluies et de l'hiver à l'environnement ambiant propice au développement de la maladie. L'âge avancé de la culture et l'humidité relative pendant les saisons des pluies et d'hiver influencent la libération et la dispersion des spores de rouille dans l'atmosphère, ce qui infeste donc les nouveaux plants et la maladie devient donc plus sévère pendant les saisons des pluies et de l'hiver avec la succession des générations de pathogènes. Des observations similaires ont aussi été faites sur l'éruption et la sévérité de la tache de la feuille provoquée par *Cercospora moricola* chez le mûrier (Srikantaswamy et coll., 2000). Sharma et coll., (1996) ont aussi rapporté que l'humidité relative élevée (70 à 80 %) est idéale pour le développement de la maladie de la rouille de la feuille chez le mûrier. Au Karnataka, on a rapporté le développement de la rouille de la feuille provoquée par *Puccinia arachidis*, lié à l'âge de la culture et à l'humidité relative (Krishnaprasad et coll., 1979).

On a rapporté des épidémies de rouille en rapport avec les facteurs biométéorologiques chez plusieurs cultures avec des modèles variés, comme le modèle logistique (Vanderplank, 1963) et le modèle de prédiction linéaire (Bulbule et coll., 1989). Le modèle d'auto-régression de premier ordre a été mis au point par Nargund (1989) et Benagi (1995) pour respectivement la rouille de la feuille du blé et la tache de la feuille de l'arachide. Chez le mûrier, le modèle de régression s'avère être le modèle le mieux adapté pour prédire la maladie de la rouille de la feuille.

Cette étude suggère qu'on peut prévoir la sévérité de la maladie de la rouille de la feuille chez le mûrier, d'après l'âge de la culture et l'humidité relative moyenne. On peut prévenir la sévérité de la maladie si les variables concomitantes sont connues. Il est aussi nécessaire d'avoir recours à des mesures de lutte avant le 50^{ème} jour après la taille, pour lutter efficacement contre la maladie et pour éviter les pertes de rendement foliaire.

RESPONSE OF CERTAIN AGRONOMICAL PRACTICES IN PERENNIAL CULTIVATION OF CASTOR UTILIZED FOR ERI SILKWORM REARING

M. C. SARMAH, U. HAZARIKA & R. CHAKRAVORTY

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

Castor, Ricinus communis Linn is a major host plant of eri silkworm, *Samia ricini* (Donovan). In N.E. India, the farmers are reluctant to go for regular castor plantation, due to its annual nature and recurring involvement of plantation cost every year. Hence, an attempt was made to study response of certain agronomical practices like alteration of spacing and introducing pruning in castor to grow as productive perennial plant for making eri culture more remunerative and an attractive crop. In this experiment different spacing like 1.0×1.5 , 1.5×1.5 and 2.0×2.0 and 2.5×2.5 m were tried along with pruning at different height like 0.5, 1.0, 1.5 m during June, November and March. A screened out perennial castor, NBR-1 was taken as a material to undertake the study. The study revealed that by adopting spacing 1.0×1.5 m and pruning at 1m heights during March, castor could be grown as biennial crop. Correlation coefficient studies indicated significant positive correlation of girth size, size of leaf and plant height with leaf biomass. However, there was an insignificant positive correlation of number of branches with leaf biomass.

Keyword: Castor, agronomy, spacing, pruning.

INTRODUCTION

Castor, *Ricinus communis* Linn, a major host plant of eri silkworm, is a softwood annual shrub which generally survives for 8-10 months in nature. Some times same annual plant shows perennial nature and lasts for 3-5 years or more. The anatomical structure of the stem is characteristic of dicotyledonous plants with a difference in the growth of its thickness. The collateral vascular bundles are open. They are not protected by bark and therefore the plants die even from slight frost or extreme cold (Moskin, 1986). Due to its annual nature and recurring involvement of plantation cost every year, the farmers are reluctant to go for regular castor plantation. Hence, in the N.E. region of India, most of eri farmers are taking eri culture as leisure time activity and depends on stray castor plant grown wild in their homestead or roadside. Different castor genotypes viz., Local red (non-bloomy), Local red (bloomy), Local green (non-bloomy), Agia local and T3 were screened out to isolate high yielding perennial genotype of castor by planting in 1.0×1.5 m spacing in RBD design (Anonymous, 1998-99). In this study Local red (non-bloomy) latter named as NBR-1, showed perennial nature followed by Local green (non-bloomy). Hence, it is felt necessary to identify suitable agronomical practices through alteration of spacing and introducing pruning in castor to grow as productive perennial plant for making eri culture more remunerative and attractive crop. In this experiment different spacing were tried along with pruning at different height during 3 different months. The study indicated that by adopting spacing 1.0×1.5 m and pruning at 1m height during March, castor could be grown as biennial crop effectively.

MATERIALS AND METHOD

The Local red (non-bloomy) genotypes named as NBR-1 was taken as material for the experiment. The experiment was conducted at Regional Eri Research Station, Meghalaya, India. NBR-1 was planted in the month of April following different spacing like 1.0×1.5 (control), 1.5×1.5 and 2.0×2.0 and 2.5×2.5 m following RBD design maintaining 3 replications. Data on plant height, number of branches of full-grown plant, numbers of leaf of full grown plant and leaf biomass in 4 harvests at one month interval were recorded. For pruning experiment same genotype was planted in the month of April with RBD design following 1.0×1.5 m spacing for 9 treatments in 3 replications such as, pruned during November (8 months aged plant) at 0.5 m height, 1.0 m height and 1.5 m height, pruned during March (12 months aged plant) at 0.5 m height, 1.0 m height and 1.5 m height, pruned during June (15 months aged plant) at 0.5 m height, 1.0 m height and 1.5 m height. Data on plant height up to spike, number of branches of full grown plant, leaf size (Av. of randomly collected 5 mature leaves/plant), girth size of full grown plant and leaf biomass in 4 harvests at one month interval after 3 months of pruning were recorded. For other agronomical aspects like fertilizer application, cultural operation *etc.* the package of practices of castor plantation developed by Central Muga Eri Research and Training Institute, Lahdoigarh, Jorhat, Assam (Sarmah, 2003) was followed throughout the experiment.

RESULTS

To identify the suitable spacing, different growth characters and yield parameter were studied and significantly highest leaf biomass per unit area was recorded in 1.0×1.5 m spacing (5733.6 kg and 7133.7 kg/ha in 1st and 2nd year respectively) (Table I).

Table I. Effect of different spacing on growth and leaf yield of castor.

Tableau I. Effet des différents espacements sur la croissance et le rendement foliaire du ricin.

Spacing (m)	Plant height (m)	Branches (nos.)	No. of leaves	Leaf biomass / plant (kg)		Estimated leaf yield/ha (kg)	
				1 st year	2 nd year	1 st year	2 nd year
<i>Espacement (m)</i>	<i>Hauteur du plant (m)</i>	<i>Nbre de branches</i>	<i>Nbre de feuilles</i>	<i>Biomasse foliaire / plant (kg)</i>		<i>Rendement foliaire estimé / ha (kg)</i>	
				<i>1ere année</i>	<i>2ème année</i>	<i>1ère année</i>	<i>2ème année</i>
1.0 × 1.5	2.24	1.67	17.91	215.0	267.5	5733.6	7133.7
1.5 × 1.5	2.25	2.92	28.81	272.9	269.5	4851.4	4790.6
2.0 × 2.0	2.09	3.67	27.67	265.0	294.5	2650.0	2945.8
2.5 × 2.5	2.46	2.58	29.67	288.9	293.7	1849.1	1879.8
CD (P = 0.05)	0.23	0.59	7.31	32.5	24.52		

Table II. Effect of different season and pruning height on growth and leaf yield of castor.

Tableau II. Effet des différentes saisons et hauteurs de taille sur la croissance et le rendement foliaire du ricin.

Treatment							
Months	Height of pruning (m)	Branches (nos.)	Leaf size (cm ²)	Girth size (cm)	Plant height (m)	Leaf biomass / plant / harvest (kg)	Estimated leaf biomass /ha / year (kg)
Traitement							
Mois	Hauteur de la taille (m)	Nbre de branches	Taille de la feuille (cm ²)	Circonférence (cm)	Hauteur du plant (m)	Biomasse de feuilles / plant / récolte (kg)	Biomasse estimée de feuilles / ha / an (kg)
November	0.5	5.67	731.67	7.67	2.45	296.25	7900.00
Novembre	1.0	6.00	740.33	8.33	3.00	245.42	6545.00
	1.5	8.00	745.00	10.00	2.53	297.50	7934.00
March	0.5	5.00	705.33	8.00	2.30	275.00	7334.00
Mars	1.0	5.33	862.33	8.33	2.93	344.16	9178.00
	1.5	3.67	765.00	8.00	2.28	267.50	7134.00
June	0.5	2.67	608.33	6.00	2.70	157.89	4211.00
Juin	1.0	2.33	656.67	6.00	2.13	236.11	6297.00
	1.5	2.33	563.33	6.67	1.72	148.89	3971.00
CD (P = 0.05)	2.29	39.24	1.57	0.35	37.16		

Though per plant leaf yield was higher in larger spacing the per unit yield was comparatively lower than with 1.0 × 1.5 m spacing due to lesser quantity of plant population. To evaluate suitable pruning season and height, the study indicated that the highest leaf biomass (9178 kg/ha/year) was recorded with pruning during March at the height of 1.0 m., which was significantly higher than other treatments. Significantly highest branch number was recorded in the month of November pruned at 1.5 m height followed by 1.0 m height during the same month and by March pruned at 1.0 m height. Leaf size was significantly bigger in March pruned plant at 1.0 m. height. Girth size was also significantly highest during September pruned at 1.5 m height followed by March pruned at 1.0 m height. Plant height was recorded significantly highest in the month of September pruned at 1.0 m height corresponding with the month of March at the same height. (Table II). Correlation coefficient analysis indicated a significant positive correlation between plant height ($r = 0.707$), leaf size ($r = 0.931$) and girth size ($r = 0.880$) with leaf biomass. However, insignificant positive correlation was recorded between numbers of branch with leaf biomass ($r = 0.460$) (Table III).

Table III. Correlation coefficient of growth characters with yield data.

Tableau III. Coefficient de corrélation entre les caractères de croissance et les données de rendement.

Growth and yield characters	Correlation coefficient
<i>Caractères de croissance et de rendement</i>	<i>Coefficient de corrélation</i>
Branch no. vs. leaf biomass <i>Nbre de branches contre biomasse foliaire</i>	0.460 ^{NS}
Leaf size vs. leaf biomass <i>Taille de la feuille contre biomasse foliaire</i>	0.931**
Plant height vs. leaf biomass <i>Hauteur de la plante contre biomasse foliaire</i>	0.707*
Girth size vs. leaf biomass <i>Circonférence contre biomasse foliaire</i>	0.880**

**denotes significant at P = 0.01 level / *Significatif au seuil de P = 0,01* * denotes significant at P = 0.05 level / *Significatif au seuil de P = 0,05*. NS: denotes non-significant / *Non significatif*.

DISCUSSION

The result of the study indicated that through alteration of agronomical practices the annual castor plant can be grown as perennial (biennial) one. It is generally observed that a solitary plant grows luxuriantly and last for 5-7 years. But if the individual plants are spaced too far apart, accommodation of plants per unit will be less on the other hand planting too closely will increase competition resulting in stunted growth (Midcap (2007). In annual castor plantation 1.0 × 1.0 m spacing is recommended (Sarmah, 2003). But to facilitate proliferation of more branching in systematic plantation of perennial castor, 1.0 × 1.5 m spacing was followed. Result indicated that highest leaf biomass production of 5733.6 kg and 7133.7 kg/ha in 1st and 2nd year respectively, was recorded in 1.0 × 1.5 m spacing due to larger population, although leaf yield of individual plant was less. Pruning is one of the most important cultural practices for maintaining plants and it is an invigorating process by removing the apex, it temporarily destroys apical dominance and stimulates the growth of lateral buds into shoots. Report indicated that pruning a young plant will stimulate vigorous shoot growth and will delay the development of flowers and fruit and time of pruning varies with plant species (Wade and Robert, 1999). Keeping this in view for identifying a suitable period of pruning, the castor plants were pruned at different times and heights. The result indicated that pruning during March at 1m. height was found suitable for significantly better growth and yield of castor plant and for maintaining as a perennial crop. Correlation coefficient analysis indicated leaf size, girth size and plant height had significant positive correlation with leaf biomass except insignificant correlation with number of branches. It indicated that with the increase of leaf size, girth size and plant height the leaf biomass also increased. Though number of branches increased during November pruned plants the corresponding leaf

biomass was not increased due to decrease in leaf sizes. In latter studies it was reported that by adding high dose fertilizer input *i.e.*, NPK 120:40:40 kg/ha and pruning during early part of November at 1.0m height it ensures 3 year survivability with maximum leaf yield 5050kg in the 1st year, 6190kg/acre in the 2nd year and 7580kg/acre in the 3rd year (Hazarika, 2006).

REFERENCES

- ANONYMOUS (1998-99) Screening of high yielding castor varieties. Annual Report, Regional Muga Research Station, Boko, Assam
- HAZARIKA, U., CHAKRAVORTY, R AND BARAH, A (2006) Economics of perennial castor cultivation, Ind. Silk 44 (11) pp. 13-16
- JAMES T. MIDCAP (2007) Spacing plant material: ground covers, The University of Georgia, Cooperative Extension
- MOSHKIN, V. A. (1986): Castor, Oxonian Press Pvt. Ltd. New Delhi, Calcutta. p29
- SARMAH, M.C. (2003) Eri host plant cultivation and silkworm rearing technique. CMER&TI, Lahdoigarh, Jorhat, Assam. pp 1-6
- WADE & ROBERT R. (1999) General response of pruning, Basic Principles of Pruning Woody Plants Westerfield, Extension Horticulturists, The University of Georgia, Cooperative Extension

REPONSE A CERTAINES PRATIQUES AGRONOMIQUES DANS LA CULTURE PERENNE DU RICIN UTILISE POUR L'ELEVAGE DU VER A SOIE ERI

M. C. SARMAH, U. HAZARIKA & R. CHAKRAVORTY

Central Muga Eri Research & Training Institute, Lahdoigarh – 785 700, Jorhat, Assam, Inde

Le ricin, Ricinus communis Linn est une plante hôte principale du ver à soie eri, Samia ricini (Donovan). Dans le nord-est de l'Inde, les fermiers sont réticents à faire des plantations régulières de ricin, en raison de sa nature vivace et d'un coût récurrent de plantation chaque année. Nous avons donc essayé d'étudier la réponse de certaines pratiques agronomiques, comme l'altération de l'espacement et l'introduction de la taille chez le ricin, pour le cultiver comme plante vivace productive pour faire de l'eri une culture plus rémunératrice et attirante. Dans cette expérience, nous avons essayé différents espacements tels que $1 \times 1,5$; $1,5 \times 1,5$ et $2,0 \times 2,0$ et $2,5 \times 2,5$ m, avec une taille à différentes hauteurs, telles que 0,5 ; 1 ; 1,5 m en juin, novembre et mars. Pour entreprendre l'étude, nous avons utilisé NBR-1, un ricin pérenne. L'étude révèle qu'en adoptant un espacement de $1 \times 1,5$ m et une taille à 1 m de hauteur en mars, on peut cultiver le ricin comme culture bisannuelle. Les études du coefficient de corrélation indiquent une corrélation positive significative entre la circonférence, la taille de la feuille, la hauteur du plant et la biomasse foliaire. Cependant, il y a une corrélation positive non significative entre le nombre de branches et la biomasse foliaire.

INTRODUCTION

Le ricin, *Ricinus communis* Linn, une plante hôte principale du ver à soie eri, est un buisson de bois tendre annuel, qui survit en général pendant 8 à 10 mois dans la nature. Parfois, la même plante annuelle présente une nature pérenne et dure 3 à 5 ans ou plus. La structure anatomique du tronc est caractéristique des plantes dicotylédones et son épaisseur présente des différences de croissance. Les faisceaux vasculaires collatéraux sont ouverts. Ils ne sont pas protégés par l'écorce et donc les plants meurent même d'un gel léger ou d'un froid extrême (Moskin, 1986). En raison de sa nature annuelle et d'un coût récurrent de plantation chaque année, les fermiers sont réticents à recourir à la plantation régulière de ricin. Dans la région du nord-est de l'Inde, la plupart des fermiers eri prennent donc l'élevage de l'eri comme une activité de loisir et dépendent de plants de ricin isolés, à l'état sauvage, chez eux ou sur le bord des routes. On a évalué les différents génotypes de ricin, c'est-à-dire le rouge local (sans floraison), le rouge local (à floraison), le vert local (sans floraison), l'Agia local et T3 pour isoler un génotype de ricin pérenne, à rendement élevé, en le plantant avec un espacement de $1 \times 1,5$ m, selon une conception aléatoire (Anonyme, 1998-99). Dans cette étude, le rouge local (sans floraison), nommé par la suite NBR-1, présente une nature pérenne. Il s'avère donc nécessaire d'identifier des pratiques agronomiques adaptées, telles que l'altération de l'espacement et l'introduction de la taille chez le ricin pour le cultiver comme plante pérenne productive, afin de rendre l'élevage de l'eri plus rémunérateur et plus attirant. Dans cette expérience, nous avons essayé différents espacements, ainsi que des tailles à des hauteurs différentes pendant 3 mois différents. Cette étude montre qu'en adoptant un espacement de $1 \times 1,5$ m et une taille à 1 m de hauteur en mars, on pourrait efficacement cultiver le ricin comme culture bisannuelle.

MATERIELS ET METHODES

Pour l'expérience, on prend le génotype Local red (sans floraison), nommé NBR-1 comme matériau. On réalise l'expérience à la Station de Recherche Régionale de l'Eri, à Meghalaya, en Inde. On plante NBR-1 pendant le mois d'avril en suivant différents espacements de $1 \times 1,5$ (témoin), $1,5 \times 1,5$; $2,0 \times 2,0$ et $2,5 \times 2,5$ m, selon une conception RBD, avec trois répétitions. On enregistre les données sur la hauteur du plant, le nombre de branches par plant au terme de leur croissance, le nombre de feuilles par plant au terme de leur croissance et la biomasse foliaire pour 4 récoltes, à un mois d'intervalle. Pour l'expérience de taille, on plante le même génotype pendant le mois d'avril selon une conception aléatoire en blocs, en suivant un espacement de $1 \times 1,5$ m pour 9 traitements en 3 répétitions : taille en novembre (plants âgés de 8 mois) à 0,5 m de hauteur, 1 m de hauteur et 1,5 m de hauteur, taille en mars (plants âgés de 12 mois) à 0,5 m, 1 m et 1,5 m de hauteur, taille en juin (plants âgés de 15 mois) à 0,5 m, 1 m et 1,5 m de hauteur. On enregistre les données sur la hauteur du plant jusqu'à l'épi, sur le nombre de branches du plant au terme de sa croissance, sur la taille de la feuille (moyenne des feuilles à maturité, cueillies au hasard / plant), sur la circonférence du plant au terme de sa croissance et sur la biomasse foliaire de 4 récoltes, à un mois d'intervalle, après 3 mois de taille. Pour les autres aspects agronomiques, comme l'application d'engrais, les opérations culturales etc., on suit l'ensemble des pratiques pour les plantations de ricin, mises au point par le *Central Muga Eri Research and Training Institute*, de Lahdoigarh, à Jorhat, dans l'Assam (Sarmah, 2003), tout au long de l'expérience.

RESULTATS

Pour identifier l'espacement adapté, on étudie différents caractères de croissance et de rendement et on enregistre une biomasse de la feuille significativement plus élevée, par unité de surface, avec un espacement de $1 \times 1,5$ m (5 733,6 kg et 7 133,7 kg / ha pendant respectivement la 1^{ère} et la 2^{ème} année) (Tableau I).

Bien que le rendement foliaire par plant soit plus élevé avec l'espacement le plus grand, le rendement par unité est comparativement plus faible qu'avec l'espacement de $1 \times 1,5$ m, en raison de la quantité moins importante de plants. Pour évaluer la saison et la hauteur de taille adaptées, l'étude montre qu'on enregistre la biomasse de la feuille la plus élevée (9 178 kg / ha / an), avec la taille en mars à 1 m de hauteur, qui est significativement supérieure aux autres traitements. On enregistre le nombre de branches significativement plus élevé pour la taille du mois de novembre à 1,5 m de hauteur, suivi par une taille à 1 m pendant le même mois et par une taille en mars à 1 m de hauteur. La taille de la feuille est significativement plus grande chez les plants taillés en mars à une hauteur de 1 m. La circonférence est aussi plus grande pour la taille de septembre à 1,5 m, suivie par la taille de mars à une hauteur de 1 m. On enregistre une hauteur de plant significativement plus élevée avec une taille à 1 m de hauteur pendant le mois de septembre, qui correspond avec celle de la taille du mois de mars à la même hauteur (Tableau II). L'analyse du coefficient de corrélation indique une corrélation positive significative entre la hauteur du plant ($r = 0,707$), la taille de la feuille ($r = 0,931$) et la taille de la circonférence ($r = 0,880$) et la biomasse de la feuille. Cependant, on enregistre une corrélation positive non significative entre le nombre de branches et la biomasse de la feuille ($r = 0,460$) (Tableau III).

DISCUSSION

Les résultats de l'étude indiquent qu'on peut cultiver la plante de ricin annuelle comme plante pérenne (biannuelle) par l'altération des pratiques agronomiques. On observe généralement qu'une plante seule croît de manière luxuriante et dure 5 à 7 ans. Si les plants individuels sont trop éloignés les uns des autres, il y aura moins de plants par unité, par ailleurs, si l'on plante les plants trop serrés

cela augmente la concurrence, ce qui retarde la croissance (Midcap (2007). Avec la plantation annuelle de ricin, on recommande un espacement de 1×1 m (Sarmah, 2003). Mais, pour faciliter la prolifération d'un plus grand nombre de branches dans la plantation systématique de ricin pérenne, on adopte un espacement de $1 \times 1,5$ m. Les résultats indiquent qu'on enregistre la production de biomasse de feuilles la plus élevée de 5 733,6 kg et de 7 133,7 kg / ha pendant respectivement la 1^{ère} et la 2^{ème} année, avec l'espacement de $1 \times 1,5$ m, en raison de la population plus importante de plants, bien que le rendement foliaire par plant soit moins important. La taille est l'une des pratiques culturales les plus importantes pour le maintien des plants et c'est un processus revigorant. En retirant le sommet, cela détruit temporairement la dominance apicale et cela stimule la croissance des bourgeons latéraux en pousses. Des rapports indiquent que la taille des jeunes plants stimule la croissance vigoureuse des pousses et retarde le développement des fleurs et des fruits et l'époque de la taille varie en fonction des espèces de plantes (Wade et Robert, 1999). Compte tenu de cela, pour identifier une période de taille adaptée, nous avons taillé les plants de ricin à des hauteurs et des périodes différentes. Les résultats indiquent que la taille en mars à 1 m de hauteur, s'avère adaptée pour une croissance et un rendement significativement meilleurs des plants de ricin et pour les maintenir comme culture pérenne. L'analyse du coefficient de corrélation indique que la taille de la feuille, la circonférence et la hauteur du plant ont une corrélation positive significative avec la biomasse de la feuille et une corrélation insignifiante avec le nombre de branches. Elle indique qu'avec l'augmentation de la taille de la feuille, de la longueur de la circonférence et de la hauteur du plant, la biomasse de la feuille augmente aussi. Bien que le nombre de branches augmente chez les plants taillés en novembre, la biomasse correspondante de la feuille n'augmente pas, en raison de la diminution de la taille des feuilles. Dans les dernières études, on a rapporté qu'en ajoutant une dose élevée d'engrais, c'est-à-dire NPK 120 : 40 : 40 kg / ha et en procédant à une taille, pendant la première partie de novembre à une hauteur de 1 m, cela assure une survie de 3 ans, avec un rendement foliaire maximum de 5 050 kg pendant la 1^{ère} année, de 6 190 kg / demi hectare pendant la 2^{ème} année et de 7 580 kg / demi hectare pendant la 3^{ème} année (Hazarika, 2006).

