



Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY

Managing Director
Chief Editor

COMITE DE REDACTION
EDITORIAL BOARD

ALMEIDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
CAPPELLOZZA S. (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*)
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

Assessment of homozygosity using RAPD markers in silkworm breeds developed through application of androgenesis and parthenogenesis 261

Evaluation de l'homozygotie en utilisant les marqueurs RAPD chez des lignées de ver à soie obtenues par l'application de l'androgénèse et de la parthénogénèse 267

RAVINDRA SINGH, S. SREEKUMAR, D. GANGOPADHYAY, R. NIRUPAMA & S. K. ASHWATH

Pathogenicity of newly isolated microsporidian Sp. NIK-5hm in silkworm, *Bombyx mori* L. 271

Pathogénicité d'une nouvelle microsporidie NIK-5hm chez le ver à soie *Bombyx mori* L. 277

T. SELVAKUMAR, B. NATARAJU, S. D. SHARMA, M. BALAVENKATASUBBAIAH, K. CHANDRASEKHARAN & P. SUDHAKARA RAO

Growth and food utilisation efficiency in fifth instar larvae of *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae) under stress and its effect on silk production 281

Effet du stress sur la croissance et l'efficacité d'utilisation de la nourriture et sur la production de soie chez les larves du cinquième âge d'*Antheraea mylitta* (Lépidoptère : Saturnidae) 289

S. S. RATH

Rapports techniques / Technical reports

Positive influence of phylloplane microflora on gut microflora and growth and development of Indian silkworm breeds 295

Influence positive de la microflore du phylloplane sur la microflore de l'intestin et sur la croissance et le développement des lignées de ver à soie indiennes 303

P. MOHANRAJ, S. SUBRAMANIAN & M. MUTHUSWAMI

Impact of « tasar guard » on tasar silkworm (*Antheraea mylitta* D.) rearing performance and incidence of diseases under tropical conditions 309

Impact du tasar guard sur la performance d'élevage du ver à soie tasar (*Antheraea mylitta* D.) et sur l'incidence des maladies dans des conditions tropicales 317

P. VENKATARAMANA, B. NARASIMHA MURTHY, J. V. KRISHNA RAO, P. JAYAPRAKASH & S. B. DANDIN

Development and transfer of microbial technology for protection of tasar cocoon crop at field level 321

Mise au point et transfert d'une technologie microbienne pour la protection de la récolte de cocons tasar sur le terrain 331

D. K. ROY, ALOK SAHAY, G. P. SINGH, N. G. OHJA & N. B. VIJAYAPRAKASH

Tasar egg carrying and incubation device (TEC-AID), a simple tool for scientific handling of tasar seed 335

Système de transport et d'incubation des oeufs tasar (TEC-AID), un outil simple pour la manipulation scientifique des graines tasar 347

R. MANOHAR REDDY, N. SURYANARAYANA & G. V. PRASAD

Differential screening for salinity tolerance in high yielding Indian mulberry, <i>Morus indica</i> genotypes	353
Evaluation différentielle de la tolérance à la salinité chez des génotypes de mûrier indiens de <i>Morus indica</i> à rendement élevé	365
S. LAL & P. KHURANA	

Influence of cyanobacterial biofertilizer on soil nutrients and mulberry leaf quality and its impact on silkworm rearing	373
Influence de l'engrais biologique cyanobactérien sur les nutriments du sol et sur la qualité de la feuille de mûrier et impact sur l'élevage du ver à soie	385
D. M. RAM RAO, DASAPPA & T. SELVA KUMAR	

Brief note / Note brève

<i>Nesolynx thymus</i>, a bio-control agent of uzi fly, <i>Blepharipa zebina</i> walker in tasar silkworm, <i>Antheraea mylitta</i> D.	391
<i>Nesolynx thymus</i> , un agent de lutte biologique contre la mouche uzi, <i>Blepharipa zebina</i> Walker chez le ver à soie tasar <i>Antheraea mylitta</i> D.	397
RAM KISHORE, A. K. DEBNATH & N. SURYANARAYANA	

ASSESSMENT OF HOMOZYGOSITY USING RAPD MARKERS IN SILKWORM BREEDS DEVELOPED THROUGH APPLICATION OF ANDROGENESIS AND PARTHENOGENESIS

RAVINDRA SINGH*, S. SREEKUMAR, D. GANGOPADHYAY**, R. NIRUPAMA &
S. K. ASHWATH

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

*Level of homozygosity using random amplified polymorphic DNA (RAPD) has been assessed in some breeds of the mulberry silkworm, **Bombyx mori** L. developed through androgenesis and parthenogenesis. No polymorphism in DNA is detected among the individuals randomly selected indicating the attainment of homozygosity in their genetic make-up. Further, shared RAPD fragments found in all the individuals of DNB series with fixed frequencies (monomorphic) imply their close genetic relationships while RAPD profiles within the inbred lines of AGL series when amplified with OPA11 and OPD2 clearly indicate that the lines have achieved considerable homozygosity in their genetic constitution.*

Keywords: Androgenesis, *Bombyx mori*, homozygosity, parthenogenesis, random amplified polymorphic DNA (RAPD).

INTRODUCTION

Androgenesis and parthenogenesis acquire special significance in the development of outstanding genotypes with uniform populations, high viability, hybrid vigour and combining ability (Strunnikov, 1986; Gangopadhyay and Ravindra Singh, 2007), serve as useful tools in rapid multiplication of superior segregates from the high yielding varieties (Xu *et al.*, 1997; Nacheva *et al.*, 1999) and reduction in selection pressure as well as shortening of breeding cycle (Takei *et al.*, 1990). Attempts have been made on genetic variability in silkworm through DNA fingerprinting (Tretjak *et al.*, 1992; Sreekumar *et al.*, 2006). The present study has been undertaken to know the level of homozygosity in some newly developed breeds of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* through application of breeding strategies like androgenesis and parthenogenesis.

MATERIALS AND METHODS

A Chinese type bivoltine silkworm breed DNB₁ (plain larvae; oval cocoons) was developed utilizing CSR₁₈ and CSR₁₂ whereas two Japanese type bivoltine breeds with entirely female parthenoclonal *viz.*, DNB₆ and DNB₇ (marked larvae; dumbbell cocoons) were developed utilizing CSR₁₉ and CSR₄ as breeding resource materials. Artificial parthenogenesis was induced as per Astaurov (1957) to obtain genetically stabilized breeds. Five polyvoltine breeds *viz.*, AGL₁, AGL₂, AGL₃, AGL₄ and AGL₅ with plain larvae and greenish yellow oval cocoons were developed following repeated backcrosses with androgenetic males to transmit homozygosity in the lines. Androgenetic development in the oviposited eggs was induced by exposing the eggs in hot air at 38°C

* Regional Sericultural Research Station, Jorhat -785 005, Assam, India.

** National Institute of Science Technology & Development Studies, New Delhi - 110 012, India.

for 200 min. Nistari, a polyvoltine race possessing dominant gene for golden yellow cocoon colour and marked larvae was utilized as a marker to identify androgenetic male individuals.

Genomic DNA of DNB and AGL series were isolated from 3-day-old larvae of Vth instar after removing midguts and haemolymph. Concentration and purity of extracted DNA was determined spectrophotometrically at 260 nm and 280 nm. Samples showing the 1 OD equivalent to 50 µg/ml and purity (determined by the ratio of 260 nm and 280 nm) 1.8 alone were taken for analysis. Dilution was made to a final concentration of 20 ng/µl of Tris-EDTA buffer (5 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 8.0) for RAPD analysis and extracted DNA was preserved at -20 °C.

For the assessment of homozygosity, 8 random decamer primers from Operon Technologies Inc., Alameda, USA (OPAA2, OPAA5, OPAH1, OPA5, OPA11, OPA20, OPC4, and OPD2) were tested on 8 individuals each taken from the bisexual line DNB₁, female parthenoclonal lines DNB₆ and DNB₇ and androgenetic lines AGL₁, AGL₂, AGL₃, AGL₄ and AGL₅. Out of the 8 random decamer primers used, 7 primers (excluding OPAA5 which was not amplified) that produced repeatable, sharp and clearly stained fragments were selected for the analysis of homozygosity among 16 individuals of DNB series and 20 individuals of AGL series.

PCR reactions were carried out in a PTC 200 gradient thermal cycler (MJ research, USA) employing the RAPD primers. Amplifications were performed in 25 µl reactions containing 1 × reaction buffer (100 mM Tris, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 6-8 p moles of primer, 200 mM dNTPs, 2 U *Taq* DNA polymerase and 20 ng of template DNA. A negative control was set up omitting the DNA from the reaction mixture for checking the DNA for cross contamination. The reaction mixture was pre-heated at 95 °C for 3 minutes followed by 40 cycles (94 °C for 180 seconds, 40 °C for 90 seconds and 72 °C for 120 seconds). The reaction was then subjected to a final extension at 72 °C for 10 minutes. The resulting products were electrophoretically analyzed through 1.5 % agarose gels containing ethidium bromide (5 µg / ml) in 1 × TAE buffer (pH 8.0) and digitally captured using the Gel Doc. System (Syngene, USA). The alleles were designated according to the PCR product size in relation to the molecular marker (λ DNA with *Eco*R1 / *Hind* III double digest). All amplification reactions were carried out at least thrice in order to make sure consistency and repeatability of the profiles generated using selected RAPD primers.

RESULTS

In the present study, RAPDs were used for the analysis of the DNA profiles of the silkworm breeds developed through the application of androgenesis and parthenogenesis. No polymorphism in DNA was detected among the individuals randomly selected indicating the attainment of homozygosity in their genetic make-up. Further, shared (common) RAPD fragments found in all individuals of DNB lines with fixed frequencies (monomorphic) observed in all investigated primers, imply their close genetic relationships. The RAPD DNA pattern of all the randomly selected individuals belonging to parthenogenetic bisexual line DNB₁ (both male and female) and entirely female parthenoclonal line DNB₇ have shown identical banding pattern clearly suggesting the attainment of homozygosity (Fig. 1). The amplification product with decamer OPA20 revealed 1 band of 1700 base pairs (bp) specific to DNB₇. One thousand two hundred and fifty bp bands specific to DNB₆ and DNB₇ appeared in the DNA profile indicate their close genetic relationship. DNB₁ males and females shared 2 bands (1100 and 1000 bp). A total of 28 scorable, discrete amplicons were generated when the template DNA of AGL series (AGL₁ to AGL₅) were amplified with 7 random primers at an average of 4 bands per primer. The analysis has shown identical RAPD profiles within the inbred lines of AGL series when amplified with OPA11, and OPD2 (Fig. 2) indicating the accomplishment of homozygosity of the lines at the molecular level. The two bands with 1870 and 1650 bp are seen common in all the AGL series analyzed.

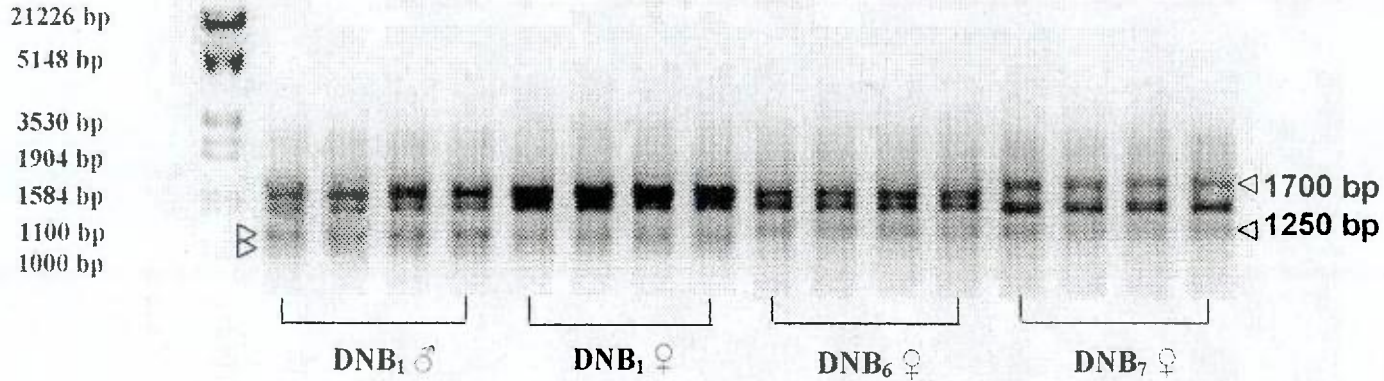


Fig. 1. Identical RAPD profiles of DNB parthenogenetic lines amplified with OPA20 decamer. Arrows indicate 1700 bp product specific to DNB7 line, 1250 bp band specific to DNB6 and DNB7, 1100 & 1000 bp amplified products found in DNB1 males and females.

Fig. 1. Profils RAPD identiques des lignées parthénogénétiques DNB amplifiées avec le décimère OPA20. Les flèches indiquent le produit de 1700 pb spécifique à la lignée DNB7, la bande 1250 pb spécifique à DNB6 et à DNB7, les produits amplifiés 1100 et 1000 pb trouvés chez les mâles et les femelles DNB1.

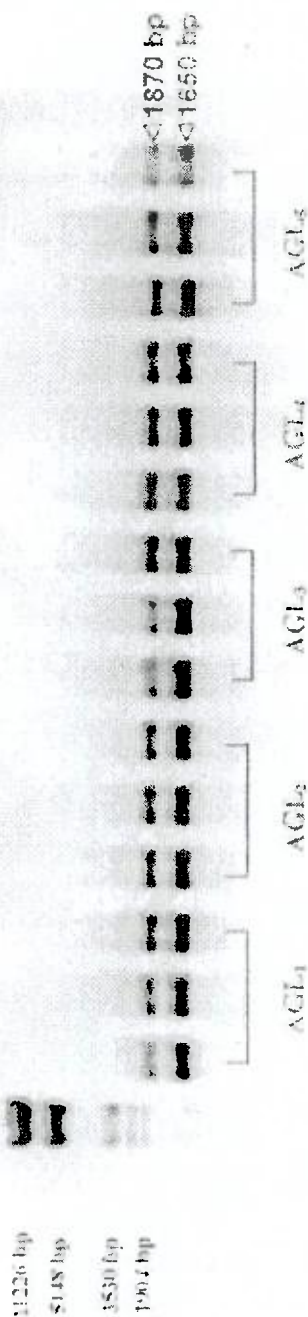


Fig. 2. Identical RAPD profiles of AGL androgenetic lines amplified with OPD2 decamer. Arrows indicate 1870 and 1650 bp products common to all the AGL lines.

Fig. 2. Profils RAPD identiques des lignées androgénétiques amplifiées avec le décimère OPD2. Les flèches indiquent les produits 1870 et 1650 pb communs à toutes les lignées AGL.

DISCUSSION

Parent-ship analysis of the mother snake, *Python molurus bivittatus* was carried out using microsatellites and AFLP to confirm genetic evidence of parthenogenesis (Groot *et al.*, 2003). Tretjak *et al.* (1992) have carried out a comparative analysis of total cell DNA from parthenogenetic individuals of *B. mori* with M13 phage as a DNA probe and demonstrated identical hybridization patterns in both parents and offsprings developed through ameiotic parthenogenesis. Genotypic variability has been studied in silkworm breeds through banded krait minor satellite DNA-derived probe (Nagaraju *et al.*, 1995) and AFLP molecular markers (Zhang *et al.*, 2004). Linkage maps based on molecular markers including randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) (Yasukochi, 1988; Promboon *et al.*, 1995), banded krait minor satellite DNA-derived probe (Nagaraju *et al.*, 1995), amplified length polymorphisms (AFLP) (Tan *et al.*, 2001), restriction length polymorphisms (RFLP) (Kadono-Okuda *et al.*, 2002; simple sequence repeat and RAPDs (Miao *et al.*, 2005; Nagaraju *et al.*, 2005), Nguu *et al.*, 2005, microsatellites (Miao *et al.*, 2005) and single nucleotide polymorphism (SNP) (Yamamoto *et al.*, 2006) are being used for the genome analysis and heterozygosity studies in silkworm.

In genome analysis, application of PCR based RAPD (Nagaraju and Singh, 1995; Chatterjee and Pradeep, 2003) have indicated their potential utility as markers in silkworm for tagging genes of interest. Further, RAPD molecular linkage map in silkworm has been constructed (Yasukochi, 1988; Li *et al.*, 1998). Genetic mapping using RAPD markers has several advantages like shorter time (1-2 days) to complete analysis after standardization, prior information on the genome, availability of series of primers for analysis, minimal operational cost and relatively small amount (= 20 ng) of high molecular weight DNA. Therefore, genetic maps consisting of RAPD markers can be obtained more efficiently and with greater marker densities compared to RFLP or targeted PCR-based methods (Williams *et al.*, 1990).

In sexual reproduction, the fusion of ovum with a sperm leading to formation of a new zygote creates striking variability in the resulting organism. This variability favours the opportunity of natural and artificial selection. Continuous domestication and selection has made the silkworm a diversified genotype. Conventional breeding approaches have no doubt remarkably increased the quantum of silk production but continuous selection has resulted in decline of the targeted characters when the selection intensity is discontinued. The novel breeding approaches like androgenesis and parthenogenesis would be of immense use in the development of homozygous silkworm breeds which are of utmost important in breeding programmes to evolve superior silkworm breeds as well as to obtain hybrids with high viability, hybrid vigour, combining ability and less phenotypic variability.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Department of Science and Technology, New Delhi for the financial assistance.

REFERENCES

- ASTAUROV B. L. (1957) High temperature as a tool for controlling development and sex determination: A review of studies in artificial parthenogenesis, androgenesis and elimination of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Proc. Zool. Soc. Calcutta*, Mookerjee Memoir, 1, 29-56.
- CHATTERJEE S. N. & PRADEEP A. R. (2003) Molecular markers (RAPD) associated with growth, yield and origin of silkworm, *Bombyx mori* L. in India. *Genetica*, 39, 1612-1624.
- GANGOPADHYAY D. & RAVINDRA SINGH (2007) Development and evaluation of parthenoclonal lines of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 47(3), 259-269.

- GROOT T. V. M., BRUINS E. & BREEUWER J. A. J.(2003) Molecular genetic evidence for parthenogenesis in Burmese python, *Python molurus bivittatus*. Heredity, 90(2), 130-135.
- LIB., LU C., ZHOU Z. Y. & XIANG Z. H.(1998) Construction of silkworm RAPD molecular linkage map. Genes Genet Syst., 73, 243-254.
- MIAO X.-X., XU S.-J., LI M.-H., LI M. W. & HUANG J.-H.(2005) Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 102,16303-16308.
- NACHEVA Y., PETKOV N., TZENOV P., MALINOVA K. & GENSU C.(1999) Breeding of bisexual lines of the silkworm, *Bombyx mori* L. with androgenetic origin. Bull. Ind. Acad. Seric., 3(1), 36-41.
- NAGARAJA G. M., MAHESH G., SATISH V., MADHU M. & MUTHULAKSHMI M.(2005) Genetic aping of Z chromosome and identification of W chromosome-specific markers in the silkworm, *Bombyx mori*. Heredity, 95,148-157.
- NAGARAJU J. & SINGH L.(1995) Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its significance in silkworm *Bombyx mori*. Electrophoresis,16,1633- 1638.
- NAGARAJU J., SHARMA A., SETHURAMAN B. N., RAO G. V. & SINGH L.(1995) DNA fingerprinting in silkworm, *Bombyx mori* using banded krait minor satellite DNA-derived probe. Electrophoresis, 16, 1639-1642.
- NGUU E. K., KADONO-OKUDA K., MASE K., KOSEGAWA E. & HARA W.(2005) Molecular linkage group for the silkworm, *Bombyx mori*, based on restriction fragment length polymorphism of cDNA clones. J. Insect Biotechnol. Sericology, 74, 5-13.
- KADONO-OKUDA K., KOSEGAWA E., MASE K. & HARA W.(2002) Linkage analysis of maternal EST cDNA clones covering all twenty eight chromosomes in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Mol. Biol., 11, 443-451.
- PROMBOON A., SHIMADA T., FUJIWARA H., & KOBAYASHI M.(1995) Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. Genet. Res., 66, 1-7.
- SREEKUMAR S., ASHWATH S. K., DANDIN S. B., CHITRA S., VIRENDRA KUMAR & BASAVARAJA H. K.(2006) Identification of silkworm breeds using microsatellite as markers. Indian Silk, 45(7), 5-7.
- STRUNNIKOV V. A.(1986) Nature of heterosis and combining ability in the silkworm. Theor. Appl. Genet., 72, 503-512.
- TAKEI R., NAKAGAKI M., KODOIRA R. & NAGASHIMA E.(1990) Factor analysis on the parthenogenetic development of ovarian eggs in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Entomol. Zool., 25, 43-48.
- TAN Y. D., WAN C., ZHU Y., LU C., ZIANG Z. & DENG H. W.(2001) An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. Genetics, 157, 1277-1284.
- TRETJAK A. P., RYSKOV A. P., SEVASTYANOVA G. A., FILIPPOVICH Y. B. & STRUNNIKOV V. A.(1992) DNA fingerprintings of *Bombyx mori* L.:Testing of genotypic variability of parthenogenetic strains. Genetika, 28, 171-175.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A., TINGEY S. V.(1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535.
- XU A. N., LI M. W., FANG A., FEI M. H. & HUANG T. T.(1997) Isolation of a self breed line of *Bombyx mori* L. by means of dispermic androgenesis. Sericologia, 37, 199-204.
- YAMAMOTO K., NARUKAWA J., KADONO-OKUDA K., NOHATA J., SASANUMA M., SUETSUGU Y., BANNO Y., FUJII H. & GOLDSMITH M. R. (2006) Construction of a single nucleotide polymorphism linkage map for the silkworm, *Bombyx mori*, based on bacterial artificial chromosome end sequences. Genetics, 73,151-161.
- YASUKOCHI Y.(1988) A dense genetic linkage map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. Genetics, 150, 1513-1525.
- ZHANG J., ZHONG B., DING N., WU W. & ZHAO L.(2004) Identification of 6 *Bombyx mori* varieties using AFLP molecular markers. Canye Kexue, 30, 137-142.

EVALUATION DE L'HOMOZYGOTIE EN UTILISANT LES MARQUEURS RAPD CHEZ DES LIGNEES DE VER A SOIE, OBTENUES PAR L'APPLICATION DE L'ANDROGENESE ET DE LA PARTHENOGENESE

RAVINDRA SINGH*, S. SREEKUMAR, D. GANGOPADHYAY**, R. NIRUPAMA & S. K. ASHWATH

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

*On a évalué le niveau d'homozygotie en utilisant l'ADN polymorphique amplifié de manière aléatoire (RAPD) chez certaines lignées du ver à soie du mûrier, **Bombyx mori** L. mis au point par androgenèse et parthénogenèse. On ne détecte aucun polymorphisme de l'ADN parmi les individus sélectionnés de manière aléatoire, ce qui indique l'acquisition de l'homozygotie dans leur constitution génétique. Par ailleurs, les fragments RAPD partagés que l'on trouve chez tous les individus de la série DNB avec des fréquences fixes (monomorphiques) signifient qu'ils ont des relations génétiques proches, tandis que les profils RAPD chez les lignées consanguines de la série AGL, quand on les amplifie avec OPA11 et OPD2, indiquent clairement une homozygotie considérable dans la constitution génétique de ces lignées.*

INTRODUCTION

L'androgenèse et la parthénogenèse ont pris une signification particulière dans la mise au point de génotypes supérieurs, les populations étant uniformes, avec une viabilité, une vigueur hybride et une capacité combinatoire élevées (Strunnikov, 1986 ; Gangopadhyay et Ravindra Singh, 2007) et elles servent d'outils utiles pour la multiplication rapide de ségrégants supérieurs, à partir de variétés à rendement élevé (Xu et coll., 1997 ; Nacheva et coll., 1999), pour diminuer la pression de la sélection, ainsi que pour raccourcir le cycle de lignage (Takei et coll., 1990). On a procédé à des essais sur la variabilité génétique chez le ver à soie par les empreintes ADN (Tretjak et coll., 1992 ; Sreekumar et coll., 2006). Cette étude a été réalisée pour connaître le niveau d'homozygotie chez certaines lignées du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* venant d'être mises au point par l'application de stratégies de lignage comme l'androgenèse et la parthénogenèse.

MATERIELS ET METHODES

On a mis au point une lignée de ver à soie bivoltine de type chinois DNB1 (larves unies, cocons ovales) en utilisant CSR18 et CSR12, tandis qu'on a mis au point deux lignées bivoltines de type japonais, avec des parthénoclonales entièrement femelles, DNB6 et DNB7 (larves marquées, cocons cintrés) en utilisant CSR19 et CSR4 comme matériels ressource pour le lignage. On induit la parthénogenèse artificielle d'après la méthode d'Astaurov (1957) pour obtenir des lignées stabilisées sur le plan génétique. On met au point cinq lignées bivoltines, AGL1, AGL2, AGL3, AGL4 et AGL5 aux larves unies et aux cocons ovales jaune vert, en suivant des croisements de retour répétés avec des mâles androgénétiques, pour transmettre l'homozygotie chez les lignées. On induit le

* Regional Sericultural Research Station, Jorhat – 785 005, Assam, Inde.

** National Institute of Science Technology & Development Studies, New Delhi – 110012, Inde.

développement androgénétique chez les œufs pondus en exposant les œufs à l'air chaud à 38° C pendant 200 min. On utilise Nistari, une race polyvoltine possédant un gène dominant pour la couleur du cocon jaune doré et des larves marquées comme marqueur pour identifier les individus mâles androgénétiques.

On extrait l'ADN génomique des séries DNB et AGL chez des larves du 5^{ème} âge de 3 jours, après avoir retiré l'intestin moyen et l'hémolymph. On détermine la concentration et la pureté de l'ADN de manière spectrophotométrique à 260 nm et 280 nm. Pour l'analyse, on prend les échantillons présentant 1 DO équivalent à 50 µg / ml et avec une pureté de 1,8 (déterminée par le ratio de 260 nm et sur 280 nm). On procède à une dilution pour faire une concentration finale de 20 ng / µl dans un tampon Tris-EDTA (5mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH de 8,0) pour l'analyse RAPD et on conserve l'ADN extrait à -20° C.

Pour l'évaluation de l'homozygotie, on teste 8 amorces décimères aléatoires d'Operon Technologies Inc., Alameda, USA (OPAA2, OPAA5, OPAH1, OPA5, OPA11, OPA20, OPC4 et OPD2) sur 8 individus, chacun pris chez la lignée bisexuelle DNB1, chez les lignées parthénoclonales femelles DNB6 et DNB7 et chez les lignées androgénétiques AGL1, AGL2, AGL3, AGL4 et AGL5. Sur les 8 amorces décimères aléatoires utilisées, on sélectionne 7 amorces (sauf OPAA5 qui n'est pas amplifiée) qui produisent des fragments répétés, nets et clairement colorés pour l'analyse de l'homozygotie parmi 16 individus de la série DNB et 20 individus de la série AGL.

On procède aux réactions PCR dans un thermocycleur PTC 200 sur gradients (MJ Research, USA) en employant les amorces RAPD. On réalise les amplifications dans des réactions de 25 µl contenant un tampon de réaction de 1 × (100 mM Tris, 500 mM KCL, de la gélatine à 0,1 %, un pH de 9,0), 1,5 mM de MgCl2, 6 à 8 pmoles d'amorce, 200 mM de dNTPs, 2 U d'ADN polymérase *Taq* et 20 ng de matrice ADN. On met en place un témoin négatif en omettant l'ADN dans le mélange de réaction pour vérifier la contamination d'ADN. On préchauffe le mélange de réaction à 95° C pendant 3 minutes suivi par 40 cycles (94° C pendant 180 secondes, 40° C pendant 90 secondes et 72° C pendant 120 secondes). Puis, on soumet la réaction à une extension finale à 72° C pendant 10 minutes. On analyse les produits obtenus de manière électrophorétique sur des gels d'agarose à 1,5 % contenant du bromure d'éthidium (5 µg / ml) dans un tampon 1 × TAE (pH 8,0) et on les analyse de manière digitale en utilisant le Système Gel Doc (Syngene, USA). On désigne les allèles selon la taille du produit PCR en rapport avec le marqueur moléculaire (λ DNA avec une double digestion *EcoRI* / *Hind III*). On procède à toutes les réactions d'amplification au moins trois fois pour s'assurer de la constance et de la répétitivité des profils obtenus en utilisant les amorces RAPD sélectionnées.

RESULTATS

Dans cette étude, on utilise les RAPD pour l'analyse des profils ADN des lignées de ver à soie mises au point par l'application de l'androgenèse et de la parthénogenèse. On ne détecte aucun polymorphisme de l'ADN parmi les individus sélectionnés au hasard, ce qui indique que leur constitution génétique présente une homozygotie réussie. Par ailleurs, les fragments RAPD communs que l'on trouve chez tous les individus des lignées DNB avec des fréquences fixes (monomorphiques), que l'on observe dans toutes les amorces étudiées, sous-entendent qu'ils ont des relations génétiques proches. Le schéma ADN RAPD de tous les individus sélectionnés au hasard, qui appartiennent à la lignée parthénogénétique bisexuelle DNB1 (à la fois mâle et femelle) et à la lignée parthénoclone entièrement femelle DNB7, présente un schéma identique de bandes, ce qui suggère clairement que l'homozygotie a réussi (Fig. 1). Le produit amplifié avec le décimère OPA20 révèle 1 bande de 1700 paires de base (pb) spécifique à DNB7. Les bandes de mille deux cent cinquante bp spécifiques à DNB6 et DNB7, qui apparaissent dans le profil ADN indiquent leur relation génétique proche. Les mâles et les femelles DNB1 partagent 2 bandes (1100 et 1000 pb). Un ensemble de 28 amplicons, discrets, traçables est généré, quand on amplifie la matrice ADN de la série AGL (AGL1 à AGL5) avec 7 amorces aléatoires, avec une moyenne de 4 bandes par amorce. L'analyse montre des profils

RAPD identiques chez les lignées consanguines de la série AGL quand on les amplifie avec OPA11 et OPD2 (Fig. 2), ce qui indique, qu'au niveau moléculaire, l'homozygotie des lignées est accomplie. On voit les deux bandes avec 1870 et 1650 pb chez toutes les séries AGL analysées.

DISCUSSION

On a procédé à l'analyse de parenté chez le serpent mère, *Python molurus bivittatus* en utilisant des microsatellites et l'AFLP pour confirmer la preuve génétique de la parthénogenèse (Groot et coll., 2003). Tretjak et coll., (1992) ont réalisé une analyse comparative de l'ADN total de la cellule chez des individus parthénogénétiques de *B. mori* avec le phage M13 comme sonde ADN et montré des schémas d'hybridation identiques à la fois chez les parents et chez la descendance obtenue par parthénogenèse améiotique. On a étudié la variabilité génotypique chez les lignées de ver à soie à travers les bandes des sondes dérivées de l'ADN micro satellite (Nagaraju et coll., 1995) et les marqueurs moléculaires AFLP (Zhang et coll., 2004). On utilise les cartes de liaison basées sur les marqueurs moléculaires y compris sur l'ADN polymorphique amplifié de manière aléatoire (RAPD) (Yasukochi, 1988 ; Promboon et coll., 1995), les bandes des sondes dérivées de l'ADN micro satellite (Nagaraju et coll., 1995), les polymorphismes de longueur amplifiée (AFLP) (Tan et coll., 2001), les polymorphismes de longueur de restriction (RFLP) (Kadono-Okuda et coll., 2002); la répétition de séquence simple et les RAPDS (Miao et coll., 2005 ; Nagaraju et coll., 2005, Nguu et coll., 2005) les microsatellites (Miao et coll., 2005) et le polymorphisme d'un nucléotide (SNP) (Yamamoto et coll., 2006) pour l'analyse du génome et pour les études d'hétérozygotie chez le ver à soie.

Dans l'analyse du génome, l'application des RAPD basés sur la PCR (Nagaraju et Singh, 1995 ; Chatterjee et Praedep, 2003) a montré son utilité potentielle chez le ver à soie pour marquer des gènes d'intérêt. Par ailleurs, on a construit la carte de liaison moléculaire RAPD (Yasukochi, 1988 ; Li et coll., 1998). La cartographie génétique en utilisant des marqueurs RAPD présente plusieurs avantages comme une durée plus courte (1 à 2 jours) pour réaliser l'analyse après la standardisation, une information préalable sur le génome, la disponibilité d'une série d'amorces pour l'analyse, un coût opérationnel minimal et une quantité relativement petite (= 20 ng) d'ADN de poids moléculaire élevé. On peut donc obtenir des cartes génétiques constituées de marqueurs RAPD plus efficacement et avec des densités de marqueur plus importantes, par comparaison aux méthodes RFLP ou ciblées sur la PCR (Williams et coll., 1990).

Dans la reproduction sexuelle, la fusion de l'œuf avec un spermatozoïde entraîne la formation d'un nouveau zygote, ce qui crée une variabilité de l'organisme obtenu. Cette variabilité favorise la sélection naturelle et artificielle. La domestication et la sélection continues ont fait du ver à soie un génotype diversifié. Les approches de lignage conventionnel ont sans aucun doute remarquablement augmenté la quantité de soie produite, mais la sélection continue a entraîné le déclin des caractères ciblés quand l'intensité de la sélection s'arrête. Les nouvelles approches de lignage comme l'androgenèse et la parthénogenèse pourraient être très utiles pour mettre au point des lignées de ver à soie homozygotes, qui sont très importantes dans les programmes de lignage afin d'obtenir des lignées de ver à soie supérieures, ainsi que pour obtenir des hybrides avec une viabilité, une vigueur hybride, une aptitude combinatoire élevées et moins de variabilité phénotypique.

PATHOGENICITY OF NEWLY ISOLATED MICROSPORIDIAN Sp. NIK-5hm IN SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

**T. SELVAKUMAR*, B. NATARAJU, S. D. SHARMA,
M. BALAVENKATASUBBAIAH, K. CHANDRASEKHARAN & P. SUDHAKARA RAO**

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

Several microsporidian species are known to cause microsporidiosis in silkworm. In India different microsporidian sp. viz., *Nosema bombycis* (NIK-1s), NIK-2r, NIK-3h and NIK-4m were isolated from silkworm. The microsporidia such as MCpyB1, BCpoB1 and MCcrB1 were isolated from butterflies collected from mulberry field and also infect silkworm but do not transmit to progeny. Recently one microsporidian sp., NIK-5hm was isolated and it was different from others by having spore formation inside the haemocytes of silkworm's haemolymph. In the present study its pathogenicity, site of infection and susceptibility of silkworm breeds to NIK-5hm are studied.

NIK-5hm was highly pathogenic and more virulent to silkworm than *N. bombycis*. NIK-5hm infect all the tissues viz., haemolymph including haemocytes, midgut, malpighian tubules, fat bodies, silk gland, trachea and gonads of silkworm. The infection rate / level of NIK-5hm was less in the tissues of trachea, gonad and malpighian tubules compared to *N. bombycis*. All the tested bivoltine and multivoltine silkworm breeds were susceptible to NIK-5hm and *N. bombycis*. But multivoltine breeds are found to be relatively less susceptible than bivoltine.

Keywords: NIK-5hm; Pathogenicity; Silkworm; Site of infection; Susceptibility; Virulence.

INTRODUCTION

Silkworm diseases are the main constraint for success of good cocoon harvest. In India the estimated cocoon crop loss due to different silkworm diseases was 27 – 35% and cocoon yield loss was from 11 – 15 kg / 100 dfls during different seasons (Selvakumar *et al.*, 2002). Among the different diseases, pebrine is the only disease which comes both by primary or secondary infection and occurs during all the seasons. By the middle of 19th century, *Nosema bombycis* was known as the only pathogen causing pebrine disease in silkworm. At present several microsporidia are known to cause the disease and they are *Nosema* sp. (NIS-001, NIS-M11, NIS-M14, NIK-2r and NIK-3h), *Vairimorpha* sp. (NIS-M12 and NIK-4m), *Microsporidium* sp. (NIS-M25), *Pleistophora* sp. (NIS-M27), *Thelohania* sp. (NIS-M32) and *Leptomonas* sp. (Kawarabata, 2003; Singh and Saratchandra, 2003). Recently another sp. of microsporidia was observed to cause microsporidiosis viz., NIK-5hm in silkworm which is different by its spore morphology (4.55 µm length × 2.10µm width) from the standard strain, *N. bombycis* (3.03 µm length × 2.40µm width) (Selvakumar *et al.*, 2005).

N. bombycis, NIS-001, *Vairimorpha* sp. NIS-M12 and *Pleistophora* sp. NIS-M27 are more infectious to silkworm. *Nosema* sp. NIS-M14 and *Microsporidium* sp. NIS-M25 are moderately infectious while *Thelohania* sp. NIS-M32 is low in its infectivity. The pathogenicity of *N. bombycis* and *Vairimorpha* sp. NIS-M12 is high and usually the larvae die before pupation if the infection is

* Silkworm Seed Production Centre, K. R. Nagar – 571 602, India

prior to the 4th larval instar. The other microsporidia are moderate or low infective to silkworm. *Nosema* sp. NIS-M11, NIS-M14, *Microsporidium* sp. NIS-M25 and *Thelohania* sp. NIS-M32 cause low level of mortality in the larval stages (Fujiwara, 1980; 1984 a; 1984 b).

Several authors reported that the spores of different microsporidian sp. infect different tissues and spore formation occurs in midgut epithelium, malpighian tubules, silk gland, fat bodies, adipose tissue, gonads and trachea (Fujiwara, 1980; Fujiwara, 1985; Han and Watanabe, 1988; Iwashita *et al.*, 1990; Kawarabata, 2003). In the case of M11, M12, M14 and M25, spores do not form in the midgut epithelium (Fujiwara, 1985; Han and Watanabe, 1988). The microsporidian sp. *Pleistophora* and NIK-4hm also do not form spores in the gonad tissue.

Different silkworm breeds differ in their susceptibility to the microbial infection. Resistance to pebrine disease is greater in Chinese breeds, less in Japanese and least in European breeds (Govindan *et al.*, 1998; Singh and Saratchandra, 2003; Nataraju *et al.*, 2005) and multivoltine breeds are relatively more resistant than bivoltine breeds (Patil and Geethabai, 1989).

Since the microsporidian sp. NIK-5hm forms spores inside the haemocytes in haemolymph of silkworm and there is no information on its pathogenicity, site of infection and infectivity to different silkworm breeds, the present study is carried out on its pathogenicity, site of infection in silkworm and susceptibility of different silkworm breeds.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and purification of NIK-5hm:

The silkworms infected with a microsporidian sp. NIK-5hm were homogenized, filtered and centrifuged for 15 min at 3,000 xg. The sediment was subjected to differential centrifugation and gradient centrifugation using percoll as described by Canning *et al.* (1999).

Morphological Characterization:

The length and width of purified spores of NIK-5hm and *N. bombycis* were measured by ocular micrometer under phase contrast microscope and spore length / width ratio was also calculated.

Pathogenicity:

The stock inoculum of purified NIK-5hm spores were diluted to different concentrations viz., 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 and 1×10^3 spores / ml. One ml of each concentration was smeared onto individual mulberry leaf and fed to 100 newly ecdyzed 2nd instar larvae of bivoltine breed, CSR2. Similar concentrations of standard strain, *N. bombycis* was also smeared and fed to different groups of silkworm for comparison. Three replications of 100 larvae for each treatment were maintained. The larvae were reared till spinning and mortality due to infection with NIK-5hm and *N. bombycis* was recorded. The LC₅₀ with upper and lower fiducial limits were calculated for both NIK-5hm and *N. bombycis* by Probit analysis (Finney, 1971).

Site of Infection:

The infected CSR2 breed silkworm larvae of NIK-5hm and *N. bombycis* batches were dissected in physiological saline and different tissues viz., midgut, silk gland, gonads, malpighian tubules, trachea, fat bodies and haemolymph were collected. The tissues were put separately onto the sterilized micro glass slide with a cover glass on the tissue and gently pressed. The pressed tissue was observed under phase contrast microscope at 600 × magnification. The haemocytes of infected silkworm of NIK-5hm and *N. bombycis* were also examined under phase contrast microscope for the presence of spores. The presence of spores of NIK-5hm / *N. bombycis* in respective tissues was entered as positive (+) or negative (-) and graded based on the number of spores per field as +++, ++ and + for the positive and – for the negative.

Susceptibility of silkworm breeds:

10 bivoltine and 10 multivoltine silkworm breeds were screened for their susceptibility against NIK-5hm. Second instar larvae of all the breeds were fed with mulberry leaves smeared with NIK-5hm at the concentration of 1×10^6 spores/ml. For comparison, *N. bombycis* was also fed at the same concentration and rearing conducted for 15 days. Mortality of silkworm due to NIK-5hm / *N. bombycis* infection was recorded and statistically analyzed.

RESULTS

NIK-5hm was pathogenic to silkworm in all the concentrations and caused 50 % mortality at 3.4×10^4 spores / ml concentration, whereas *N. bombycis* caused 50 % mortality at 4.5×10^6 spores / ml concentration (Table I) indicating that NIK-5hm was highly pathogenic and more virulent to silkworm than *N. bombycis*. The spore length / width Ratio varied also and it was 1 : 0.46 with NIK-5hm and 1 : 0.79 with *N. bombycis*.

Phase contrast microscopic observations of different tissues viz., haemolymph, midgut, malpighian tubules, fat bodies, silk gland, trachea and gonads of infected silkworm revealed that NIK-5hm and *N. bombycis* infect all the tissues as indicated by the presence of mature spores in all these tissues. However, infection of NIK-5hm was less in the tissue of trachea, gonad (+ +) and malpighian tubules (+) compared to that with *N. bombycis* (+ + +) (Table II). When haemocytes were examined under phase contrast microscope, mature spores were observed in the haemocytes of NIK-5hm infected silkworm (+++) and spores were not observed in the haemocytes of *N. bombycis* infected silkworm (-) (Table II).

Table I. LC₅₀ and Fiducial limits of NIK-5hm and *N. bombycis* in silkworm, *B. mori* L.

Tableau I. LC₅₀ et limites de NIK-5hm et de *N. bombycis* chez le ver à soie, *B. mori* L.

Microsporidian Sp.	Spore Length/Width Ratio	LC ₅₀ (spores/ml)	Fiducial Limits		Probit equation
			Upper	Lower	
			<i>Limites</i>		
<i>Microsporidie</i>	<i>Ratio Longueur / Largeur de la spore</i>		<i>Supérieure</i>	<i>Inférieure</i>	<i>Equation probit</i>
NIK-5hm	1 : 0.46	3.4 × 10 ⁴	7.5 × 10 ⁴	1.5 × 10 ⁴	Y = 2.94 + 0.31 x
<i>N. bombycis</i>	1 : 0.79	4.5 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁶	Y = 2.94 + 0.31 x

Table II. Site of infection by NIK-5hm and *N. bombycis* to host tissues of silkworm.Tableau II. Lieu de l'infestation par NIK-5 et par *N. bombycis* sur les tissus hôtes du ver à soie.

Sl. No.	Host Tissues	Grade of Infection	
No. de série	Tissus de l'hôte	Degré d'infestation	
		NIK-5hm	<i>N. bombycis</i>
1	Haemolymph / Hémolymph	+++	+++
2	Haemocytes / Hémocytes	+++	-
3	Midgut / Intestin moyen	+++	+++
4	Malpighian tubules / Tubes de Malpighi	+	+++
5	Fat bodies / Corps adipeux	+++	+++
6	Silk gland / Glande séricigène	+++	+++
7	Trachea / Trachée	++	+++
8	Gonads / Gonades	++	+++

-: No infection / Pas d'infestation ; +: Low infection / Faible infestation ; ++: Moderate infection / Infestation modérée ; +++: High infection / Infestation importante.

All the tested 10 bivoltine and 10 multivoltine breeds were found to be susceptible to NIK-5hm and *N. bombycis* infection. Among the two strains, NIK-5hm was highly pathogenic and caused higher mortality in silkworm than *N. bombycis* at the concentration of 1×10^6 spores / ml. In bivoltine breeds, NIK-5hm caused highest mortality in CSR18, CSR2, CSR4 and H304 breeds (48.67 - 66.33 %) than *N. bombycis* (31.67 - 34.67 %) as compared to other breeds which had a mortality ranged from 15.67 - 40.00 % and 10.00 - 25.33 % to NIK-5hm and *N. bombycis* respectively (Table III). Among multivoltine breeds, NIK-5hm caused least mortality in Mysore Princes followed by Kollegal Jawan and *C. Nichi* (4.67 - 9.33 %) and *N. bombycis* caused 3.33 - 7.00 % as compared to other multivoltine breeds like Nistari, 96A and BL69 (17.67 - 24.33 % and 12.00 - 14.00 %) against NIK-5hm and *N. bombycis*, respectively. PM, 96E, BL65 and 96C breeds were found to be more susceptible to both NIK-5hm (26.67 - 35.67 %) and *N. bombycis* (15.33 - 24.00 %) (Table III).

DISCUSSION

Pathogenicity studies of NIK-5hm indicate that it is highly pathogenic and more virulent than *N. bombycis*. Fujiwara (1980 and 1985); Han and Watanabe (1988); Iwashita *et al.* (1990) and Kawarabata (2003) reported that the spores of different microsporidian sp. infect and spore formation occur in midgut epithelium, malpighian tubules, silk gland, fat bodies, adipose tissue, gonads and trachea. The microsporidian sp. M32 form spores in muscles only (Fujiwara, 1984 b). In the case of M11, M12, M14 and M25, spores do not form in the midgut epithelium (Fujiwara, 1985; Han and Watanabe, 1988). NIK-5hm also infects different tissues like haemocytes, haemolymph, midgut, malpighian tubules, fat bodies, silk gland, trachea and gonads. However, the grade of infection was less in trachea, gonad and malpighian tubules compared to *N. bombycis*.

Table III. Susceptibility of different silkworm breeds to NIK-5hm and *N. bombycis* infection.Tableau III. Sensibilité de différentes lignées de vers à soie à l'infestation par NIK-5hm et par *N. bombycis*.

Sl. No.	Bivoltine Breeds	% Mortality in silkworm		Sl. No.	Multivoltine Breeds	% Mortality in silkworm	
		NIK-5hm	<i>N. bombycis</i>			NIK-5hm	<i>N. bombycis</i>
		% de mortalité chez le ver à soie				% de mortalité chez le ver à soie	
No. de série	Lignées bivoltines	NIK-5hm	<i>N. bombycis</i>	No. de série	Lignées polyvoltines	NIK-5hm	<i>N. bombycis</i>
1	CSR18	66.33	34.33	1	PM	35.67	24.00
2	CSR2	63.00	34.67	2	96E	30.33	18.33
3	CSR4	60.00	31.67	3	BL65	28.67	17.33
4	H304	48.67	32.00	4	96C	26.67	15.33
5	A210	40.00	25.33	5	BL69	24.33	12.00
6	B218	30.00	20.33	6	96A	19.00	14.00
7	B225	26.00	18.00	7	Nistari	17.67	12.00
8	61N	22.00	18.33	8	Kollegal Jawan	09.33	07.00
9	CSR19	20.00	15.33	9	<i>C. Nichi</i>	09.33	05.33
10	5N	15.67	10.00	10	Mysore Princes	04.67	03.33
SE ±		19.16	2.01	SE ±		9.78	6.37
CD at 5%		26.62	5.94	CD at 5%		12.90	8.82

NIK-5hm, when inoculated to both bivoltine and multivoltine breeds individually, infects all the breeds of silkworm and it is more pathogenic and virulent than *N. bombycis*. Among bivoltine and multivoltine breeds, multivoltine breeds were found relatively less susceptible than bivoltine to both microsporidian infections. Patil and Geethabai (1989) also reported that multivoltine breeds were more resistant than bivoltine breeds. Among bivoltine breeds, the breeds viz., CSR18, CSR2, CSR4 and H304 were found to be most susceptible followed by A210, B218, B225, 61N, CSR19 and 5N to both NIK-5hm and *N. bombycis*. Patil and Geethabai (1989) screened several bivoltines and recorded that NB7 was most susceptible followed by NB4D2 and KA.

Among multivoltine breeds, Mysore Princes, *C. Nichi* and Kollegal Jawan were found to be less susceptible to both NIK-5hm and *N. bombycis* and other breeds were moderately and highly susceptible. Several authors reported that Pure Mysore (PM), Nistari and *C. Nichi* breeds have high survival ability (Devaiah, 1975; Devaiah *et al.*, 1975; Patil and Geethabai, 1989) and the high survival of PM breed has been investigated. The midgut cells of Pure Mysore are renewed by the regenerative activity during the moulting stage. If the midgut cells are healthy, the infected larvae may grow rather normally. On the other hand, it was known well that the infected midgut cells are released into the lumen by the elimination of the gut cells and recover from the infection by the regenerative activity of the midgut cells (Fujiwara, 1993).

REFERENCES

- CANNING E. U., CURRY A., CHENEY S., LAFRANCHI-TRISTEM N. J. and HAQUE M. A. (1999) *Vairimorpha imperfecta* n.sp., a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Parasitol.*, 119, 273 – 286.
- DEVAIAH M. C. (1975) Studies on the pebrine disease of the silkworm, Ph.D., Thesis, University of Agricultural Sciences, GK VK., Bangalore, India.
- DEVAIAH M. C., THONTADARAYA T. S. and KRISHNASWAMI S. (1975) Susceptibility of different races of silkworm, *Bombyx mori* L. to pebrine disease, *Current Res.*, 4, 99.
- FINNEY D. J. (1971) Estimation of the median effective dose, In: *Probit analysis*. Third Edition. S. Chand and Company Ltd., New Delhi, pp. 20 - 49.
- FUJIWARA T. (1980) Three microsporidians (*Nosema spp.*) from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 49, 229 - 236.
- FUJIWARA T. (1984 a) A *Pleistophora* like microsporidian isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 398 - 402.
- FUJIWARA T. (1984 b) *Thelohania* sp. (Microsporidia: *Thelohaniidae*) isolated from the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 459 - 460.
- FUJIWARA T. (1985) Microsporidia from silkworm moths in egg-production sericulture. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 54, 108 - 111.
- FUJIWARA T. (1993) Comprehensive report on the silkworm disease control. A report on "Bivoltine Sericulture Technology Development in India" Submitted to Central Silk Board, Bangalore, India, pp. 110.
- GOVINDAN R., NARAYANASWAMY T. K. and DEVAIAH M. C. (1998) Principles of Silkworm Pathology, *Ser. Scientific Publishers*, Bangalore, India, pp. 420.
- HAN M. S. and WATANABE H. (1988) Transovarial transmission of two microsporidia in the silkworm, *Bombyx mori* and disease occurrence in the progeny population. *J. Invertebr. Pathol.*, 51, 41 - 45.
- IWASHITA Y., SUZUKI T., NAKAZATO S. and KOBAYASHI H. (1990) Multiplication and transovarial transmission of three microsporidians infecting the silkworms, *Bombyx mori*. *Tech. Bull. Seric. Sci. Inst.*, 38, 35 - 43.
- KAWARABATA T. (2003) Biology of Microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan. *J. Insect Biotec. Sericol.*, 72, 1 - 32.
- NATARAJU B., SATHYAPRASAD, MANJUNATH D. and ASWANI KUMAR C. (2005) A text book on Silkworm Crop Protection (Published by Central Silk Board) pp. 1 - 320.
- PATIL C. S. and GEETHABAI (1989) Studies on the susceptibility of silkworm races to pebrine spore, *Nosema bombycis* N. J. *Appl. Entomol.*, 108, 421 - 425.
- SELVAKUMAR T., NATARAJU B., BALAVENKATASUBBAIAH M., SHIVAPRASAD V., BAIG M., VIRENDRA KUMAR, SHARMA S. D., THIAGARAJAN V. and DATTA R. K. (2002) A report on the prevalence of silkworm diseases and estimated crop loss. (Edt. by S.B. Dandin and V.P. Gupta) *Proceedings of National Conference on Strategies for Sericulture Research and Development*. PP. 354 - 357.
- SELVAKUMAR T., NATARAJU B., CHANDRASEKHARAN K., SHARMA S. D., BALAVENKATASUBBAIAH M., SUDHAKARA RAO, THIAGARAJAN V. and DANDIN S. B. (2005) Isolation of a new microsporidian sp. (NIK-5hm) forming spores within the haemocytes of silkworm, *B. mori* L. *Int. J. Indust. Entomol.*, 11, 63-66.
- SINGH, T. and SARATCHANDRA B. (2003) Microsporidian disease of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : *Bombycidae*). *Int. J. Indust. Entomol.*, 6, 1-9.

PATHOGENICITE D'UNE NOUVELLE MICROSPORIDIE, NIK-5hm, CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

**T. SELVAKUMAR*, B. NATARAJU, S. D. SHARMA,
M. BALAVENKATASUBBAIAH, K. CHANDRASEKHARAN & P. SUDHAKARA RAO**

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

*On sait que plusieurs espèces de microsporidies provoquent la microsporidiose chez le ver à soie. En Inde, on a isolé différentes espèces de microsporidies chez le ver à soie, c'est-à-dire, *Nosema bombycis* (NIK-1s), NIK-2r, NIK-3h, et NIK-4m. On a isolé les microsporidies telles que MCpyB1, BCpoB1 et MCCrB1 sur des papillons recueillis dans des muraies, qui infestent aussi le ver à soie, mais ne se transmettent pas à la descendance. On a récemment isolé une espèce de microsporidie, NIK-5hm qui est différente des autres en ayant une formation de spores à l'intérieur des hémocytes de l'hémolymphe du ver à soie. Dans cette recherche, on a étudié la pathogénicité, la localisation de l'infestation et la sensibilité des lignées de ver à soie à NIK-5hm.*

*NIK-5hm est très pathogène et plus virulente pour le ver à soie que *N. bombycis*. NIK-5hm infeste tous les tissus, c'est-à-dire l'hémolymphe y compris les hémocytes, l'intestin moyen, les tubes de Malpighi, les corps gras, la glande séricigène, la trachée et les gonades du ver à soie. Le taux d'infestation / le niveau de NIK-5hm est moins important dans les tissus de la trachée, des gonades et des tubes de Malpighi qu'avec *N. bombycis*. Toutes les lignées de ver à soie bivoltines et polyvoltines testées sont sensibles à NIK-5hm et à *N. bombycis*. Mais les lignées polyvoltines s'avèrent relativement moins sensibles que les bivoltines.*

INTRODUCTION

Les maladies du ver à soie sont la principale contrainte pour la réussite d'une bonne récolte de cocons. En Inde, on estime les pertes de récolte de cocons provoquées par les différentes maladies du ver à soie entre 27 et 35 % et la perte de rendement en cocons entre 11 et 15 kg / 100 pontes saines pendant les différentes saisons (Selvakumar et coll., 2002). Parmi les différentes maladies, la pébrine est la seule maladie qui survient à la fois par infestation primaire ou secondaire et qui se produit pendant toutes les saisons. Au milieu du 19^{ème} siècle, *Nosema bombycis* était connu comme le seul pathogène provoquant la maladie de la pébrine chez le ver à soie. A présent, on sait que plusieurs microsporidies *Nosema* sp. provoquent la maladie (NIS-001, NIS-M11, NIS-M14, NIK-2r et NIK-3h) ; *Vairimorpha* sp. (NIS-M12 et NIK-4m), *Microsporidium* sp. (NIS-M25), *Pleistophora* sp., (NIS-M27), *Thelohania* sp. (NIS-M32) et *Leptomonas* sp. (Kawarabata, 2003 ; Singh et Saratchandra, 2003). Récemment, on a observé une autre espèce de microsporidie qui provoque la microsporidiose chez le ver à soie, c'est-à-dire, NIK-5hm, qui est différente en raison de la morphologie de sa spore (4,55 µm de longueur × 2,10 µm de largeur) de la souche standard, *N. bombycis* (3,03 µm de longueur × 2,40 µm de largeur) (Selvakumar et coll., 2005).

N. bombycis, NIS-001, *Vairimorpha* sp. NIS-M12 et *Pleistophora* sp. NIS-M27 sont plus infectieuses pour le ver à soie. *Nosema* sp. NIS-M32 est faible en infectiosité. La pathogénicité de *N. bombycis* et de *Vairimorpha* sp. NIS-M12 est élevée et en général les larves meurent avant la nymphose si l'infestation se produit avant le 4^{ème} âge larvaire. Les autres microsporidies sont

* Silkworm Seed Production Centre, K. R. Nagar – 571 602, Inde.

modérées ou sont peu infectieuses pour le ver à soie. *Nosema* sp. NIS-M11, NIS-M14, *Microsporidium* sp. NIS-M25 et *Thelohania* sp. NIS-M32 provoquent un faible niveau de mortalité pendant les stades larvaires (Fujiwara, 1980 ; 1984a ; 1984 b).

Plusieurs auteurs ont signalé que les spores de différentes espèces de microsporidies infestent les différents tissus et que la formation de spores se produit dans l'épithélium de l'intestin moyen, les tubes de Malpighi, la glande séricigène, les corps gras, le tissu adipeux, les gonades et la trachée (Fujiwara, 1980 ; Fujiwara, 1985 ; Han et Watanabe, 1988 ; Iwashita et coll., 1990 ; Kawarabata, 2003). Dans le cas de M11, M12, M14 et M25, les spores ne se forment pas dans l'épithélium de l'intestin moyen (Fujiwara, 1985 ; Han et Watanabe, 1988). Les espèces de microsporidies *Pleistophora* et NIKI-4HM ne forment pas de spores dans le tissu des gonades.

Les différentes lignées de ver à soie diffèrent dans leur sensibilité à l'infestation microbienne. La résistance à la maladie de la pébrine est plus importante chez les lignées chinoises, moins importante chez les lignées japonaises et est la plus faible chez les lignées européennes (Govindan et coll., 1998 ; Singh et Saratchandra, 2003 ; Nataraju et coll., 2005) ; les lignées polyvoltines sont relativement plus résistantes que les lignées bivoltines (Patil et Geethabai, 1989).

Puisque la microsporidie NIK-5hm forme des spores à l'intérieur des hémocytes de l'hémolymphe du ver à soie et qu'il n'y a pas d'information sur sa pathogénicité, sur la localisation de son infestation et sur l'infectiosité envers les différentes lignées de ver à soie, nous avons entrepris cette étude sur sa pathogénicité, la localisation de son infestation chez le ver à soie et la sensibilité des différentes lignées de ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

Isolement et purification de NIK-5hm :

On homogénéise les vers à soie infestés par la microsporidie NIK-5hm, on filtre et on centrifuge pendant 15 minutes à 3 000 xg. On soumet le culot à une centrifugation différentielle et à une centrifugation sur gradients en utilisant du percoll d'après la description de Canning et coll., (1999).

Caractérisation morphologique :

On mesure la longueur et la largeur des spores purifiées de NIK-5hm et de *N. bombycis* avec un micromètre oculaire sous un microscope à contraste de phase et on calcule aussi le ratio longueur / largeur.

Pathogénicité :

On dilue l'inoculum souche des spores de NIK-5hm purifiées à différentes concentrations, c'est-à-dire à 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 et 1×10^3 spores / l. On étale un ml de chaque concentration sur une feuille de mûrier et on en nourrit 100 larves du 2^{ème} âge de la lignée bivoltine, CSR2 venant de subir l'ecdysis. On étale aussi des concentrations similaires de la souche standard, *N. bombycis*, et on en nourrit les différents groupes de vers à soie à titre de comparaison. On maintient trois répétitions de 100 larves pour chaque traitement. On élève les larves jusqu'au filage et on enregistre la mortalité due à l'infestation par NIK-5hm et par *N. bombycis*. On calcule la LC₅₀ avec les limites supérieure et inférieure à la fois pour NIK-5hm et pour *N. bombycis* au moyen de l'analyse Probit (Finney, 1971).

Localisation de l'infestation :

On dissèque les larves de vers à soie de la lignée CSR2 provenant des lots infestés par NIK-5hm et par *N. bombycis* dans du sérum physiologique et on recueille les différents tissus, c'est-à-dire, l'intestin moyen, la glande séricigène, les gonades, les tubes de Malpighi, la trachée, les corps gras et l'hémolymphe. On place les tissus séparément sur une lame de verre stérilisée recouverte par un couvre lame et on appuie doucement. On observe le tissu compressé sous un microscope à contraste

de phase avec un grossissement de 600 ×. On examine aussi les hémocytes du ver à soie infesté par NIK-5hm et par *N. bombycis* sous un microscope à contraste de phase. On enregistre la présence de spores de NIK-5hm / de *N. bombycis* dans les tissus respectifs comme positif (+) ou négatif (–) et on les classe sur la base du nombre de spores par champ en tant que +++, ++ et + pour les positifs et – pour les négatifs.

Sensibilité des lignées de ver à soie :

On évalue 10 lignées de vers à soie bivoltines et 10 lignées polyvoltines par rapport à leur sensibilité à NIK-5hm. On alimente les larves du deuxième âge de toutes les lignées avec des feuilles de mûrier enduites avec NIK-5hm à la concentration de 1×10^6 spores / ml. A titre de comparaison, on administre aussi *N. bombycis* à la même concentration et on procède à l'élevage pendant 15 jours. On enregistre la mortalité du ver à soie provoquée par l'infestation NIK-5hm / *N. bombycis* et on l'analyse statistiquement.

RESULTATS

NIK-5hm est pathogène pour le ver à soie à toutes les concentrations et provoque 50 % de mortalité à une concentration de $3,4 \times 10^4$ spores / ml, tandis que *N. bombycis* provoque 50 % de mortalité à une concentration de $4,5 \times 10^6$ spores (Tableau I), ce qui indique que NIK-5hm est très pathogène et plus virulent pour le ver à soie que *N. bombycis*. Le ratio longueur / largeur des spores varie aussi et il est de 1 : 0,46 pour NIK-5hm et de 1 : 0,79 pour *N. bombycis*.

Les observations au microscope à contraste de phase des différents tissus, en l'occurrence l'hémolymph, l'intestin moyen, les tubes de Malpighi, les corps gras, la glande séricigène, la trachée et les gonades du ver à soie infesté révèlent que NIK-5hm et *N. bombycis* infestent tous les tissus, comme l'indique la présence de spores mûres dans tous ces tissus. Cependant, l'infestation de NIK-5hm est moins importante dans la trachée, les gonades (++) et les tubes de Malpighi (+) par comparaison à ceux infestés par *N. bombycis* (+++) (Tableau II). Quand on examine les hémocytes sous un microscope à contraste de phase, on observe des spores mûres dans les hémocytes du ver à soie infesté par NIK-5hm (+++) et on n'observe pas de spores dans les hémocytes du ver à soie infesté par *N. bombycis* (–) (Tableau II).

Les 10 lignées bivoltines et les 10 lignées polyvoltines testées s'avèrent sensibles à l'infestation par NIK-5hm et par *N. bombycis*. Parmi les deux souches, NIK-5hm est très pathogène et provoque une mortalité plus élevée que *N. bombycis* à la concentration de 1×10^6 spores / ml chez le ver à soie. Chez les lignées bivoltines, NIK-5hm provoque la mortalité la plus élevée chez les lignées CSR18, CSR2, CSR4 et H304 (48,67 à 66,33 %) et *N. bombycis* (31,67 à 34,67 %) alors qu'avec les autres lignées qui ont une mortalité comprise entre 15,67 et 40 % et 10 à 25,33 % respectivement avec NIK-5hm et avec *N. bombycis* (Tableau III). Parmi les lignées polyvoltines, NIK-5hm provoque la mortalité la moins importante chez Mysore Princess suivie par Kollegal Jawan et par *C. nichi* (4,67 à 9,33 %) et *N. bombycis* provoque 3,33 à 7 % de mortalité alors qu'avec les autres lignées polyvoltines comme Nistari, 96A et BL69 la mortalité varie de 17,67 à 24,33 % et DE 12 à 14 % respectivement avec NIK-5hm et avec *N. bombycis*. Les lignées PM, 96^E, BL65 et 96C s'avèrent les plus sensibles à la fois à NIK-5hm (26,67 à 35,67 %) et à *N. bombycis* (15,33 à 24 %) (Tableau III).

DISCUSSION

Les études sur la pathogénicité de NIK-5hm indiquent qu'elle est très pathogène et plus virulente que *N. bombycis*. Fujiwara (1980 et 1985) ; Han et Watanabe (1988) ; Iwashita et coll., (1990) et Kawarabata (2003) ont signalé que les spores de différentes espèces de microsporidies provoquent des infestations et qu'il se produit la formation de spores dans l'épithélium de l'intestin moyen, les tubes de Malpighi, la glande séricigène, les corps gras, le tissu adipeux, les gonades et la trachée. La

microsporidie M32 ne forme des spores que dans les muscles (Fujiwara, 1984b). Avec M11, M12, M14 et M25, il ne se forme pas de spores dans l'épithélium de l'intestin moyen (Fujiwara, 1985 ; Han et Watanabe, 1988). NIK-5hm infeste aussi les différents tissus comme les hémocytes, l'hémolymph, l'intestin moyen, les tubes de Malpighi, les corps gras, la glande séricigène, la trachée et les gonades. Cependant, le degré d'infestation est moins important dans la trachée, les gonades et les tubes de Malpighi par comparaison à *N. bombycis*.

Quand on inocule NIK-5hm individuellement à la fois aux lignées bivoltines et polyvoltines, elle infeste toutes les lignées de ver à soie et elle est plus pathogène et virulente que *N. bombycis*. Les lignées polyvoltines s'avèrent relativement moins sensibles que les bivoltines aux deux infestations par les microsporidies. Patil et Geethabai (1989) ont aussi signalé que les lignées polyvoltines sont plus résistantes que les lignées bivoltines. Parmi les lignées bivoltines, les lignées CSR18, CSR2, CSR4 et H304 s'avèrent les plus sensibles à la fois à NIK-5hm et à *N. bombycis*, suivies par A210, B218, B225, 61N, CSR19 et 5N. Patil et Geethabai (1989) ont évalué plusieurs lignées bivoltines et observé que NB7 est plus sensible suivie par NB4D2 et KA.

Parmi les lignées polyvoltines, Mysore Princes, *C. nichi* et Kollegal Jawan s'avèrent moins sensibles à la fois à NIK-5hm et à *N. bombycis* et les autres lignées sont modérément ou très sensibles. Plusieurs auteurs ont signalé que les lignées Pure Mysore (PM), Nistari et *C. nichi* ont une capacité de survie élevée (Devaiha, 1975 ; Devaiah et coll., 1975 ; Patil et Geethabai, 1989) et on a étudié la survie importante de la lignée PM. Les cellules de l'intestin moyen de Pure Mysore sont renouvelées par l'activité régénérative pendant la mue. Si les cellules de l'intestin moyen sont saines, les larves infestées peuvent croître assez normalement. D'autre part, on sait que les cellules infestées de l'intestin moyen sont libérées dans la lumière lors de l'élimination des cellules de l'intestin et se remettent de l'infestation par l'activité régénératrice des cellules de l'intestin moyen (Fujiwara, 1993).

GROWTH AND FOOD UTILISATION EFFICIENCY IN FIFTH INSTAR LARVAE OF *ANTHERAEA MYLITTA* (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) UNDER STRESS AND ITS EFFECT ON SILK PRODUCTION

S. S. RATH

Central Tasar Research & Training Institute, Piska Nagri-835 303, Ranchi, Jharkhand, India;
E-mail: ssrathlee@rediffmail.com, ssrathlee@hotmail.com

Experimental stress conditions were applied on the fifth instar larvae of *Antheraea mylitta* to assess its effect on instar duration, survivability, food utilization efficiency, growth and silk production. The various stress conditions applied were food deprivation for 4 hr (E1), 8 hr (E2), and 12 hr (E3) and parasitisation by *uzifly* (E4) and *Nosema* sp. (E5). Under stress the instar duration were extended by 1.2 to 5.8 days and the survivability declined significantly, the lowest being found in larvae under food deprivation for 12 hr (E3). The total food intake declined by 11.3% to 40.9% following 4% to 40.3% decline in digestion. The relative consumption rate (RCR) declined upon experiencing stress, the lowest consumption rate was observed in uzi infested larvae (E4), and registered a decline in growth rate (by 15.1% to 37.7%). Food utilization efficiency (AD, ECI and ECD) got affected in the larvae under stress. In *Nosema* sp. infected larvae (E5), AD increased significantly while it declined in the larvae under food deprivation (E1, E2 and E3). The ECI in E4 significantly increased but declined in E1, E2 and E3. The ECD, in the other hand, did not change upon food deprivation (E1, E2 and E3), but recorded a significant increase over control in E4 declined in E5. Silk production declined to a tune of 23.2% to 50.9% upon experiencing stress of different kinds. The results indicated that the stress caused by 12 hr food deprivation (E3) leads to higher degree of damage and the least was observed in 4 hr food deprivation (E1).

Keywords: *Antheraea mylitta*, larvae, growth, food utilization efficiency, stress, silk production.

INTRODUCTION

Larval feeding in non-feeding adult insects is an active and dynamic process. The quality and quantity of food eaten by the larva influence the growth rate, developmental time, final body weight, survival and reproductive potential in insects (Slansky and Scriber, 1985). The developmental time increases with reduced metabolism followed by decline in reproductive activity upon decreased food abundance in nature (Muthukrishnan *et al.*, 1978; Slansky, 1980; Nath *et al.*, 1990b; Rath *et al.*, 2004). Food utilization parameters and growth got affected in many insects infected with microsporidium and other parasites (Vinson and Barras, 1970; Vinson, 1972; Slansky and Scriber, 1985; Bauer and Nordin, 1988; Nath *et al.*, 1990a; Henn and Solter, 2000; Rath and Sinha, 2005; Rath *et al.*, 2000, 2003). Studies on growth, development and comparative aspects of food utilization and its effect on adult character were reported in *Antheraea mylitta* with respect to different food plants (Rath *et al.*, 2006; Rath, 2000). Insects very often fail to obtain sufficient nutrition for development following adverse physiological and ecological conditions (Raubenheimer and Simpson, 1999). The stress encountered by the larvae in the wild condition and its effect on food intake and utilization are yet to be studied as it has a direct impact on growth and silk production of an economically important insect like *A. mylitta*. The present study dealt with a comparative aspect of different stress conditions

encountered by the *A. mylitta* larvae to assess its effect on food intake and utilization, larval growth and silk production.

MATERIALS AND METHODS

Insect and bioassay:

For the entire study V instar larvae of *Antheraea mylitta* Drury (Daba Bivoltine) (Lepidoptera: Saturniidae) were chosen because of the fact that maximum food ingestion (about 81%) and assimilation (73 to 74%) were recorded during the instar with a record growth (Rath *et al.*, 2006) where the impact of stress can be studied properly. The tasar silkworm larvae *Antheraea mylitta* were reared outdoor in their natural habitat on the host plant *Terminalia tomentosa* (Rath, 2000; Rath *et al.*, 2006) till IV stadium. Soon after IV moult out the selected V stadium, larvae (average weight 11 g) were then shifted to indoor condition (temp. 22-24° C and 77-80% R.H. and 11L:13D).

There were 6 experimental conditions:

E0 =	Control (healthy V instar larvae), continuous feeding.
E1, E2 and E3 =	Healthy V instar larvae subjected to 4, 8, 12 hr food deprivation daily respectively.
E4 (Parasitisation by uzi fly) =	Healthy V instar larvae were parasitized by uzi fly (<i>Blepharipa zebina</i> Walker, Diptera: Tachinidae) on the first day as described earlier (Rath <i>et al.</i> , 2000). The level of parasitisation was maintained at 5 eggs per larvae.
E5 (Infected with microsporidia, <i>Nosema sp.</i>) =	<i>Nosema</i> infected V instar larvae (1.065×10^6 spores/ml).

Larval feeding was maintained in all experimental sets by providing sufficient quantity of pre-weighed leaves of *T. tomentosa* twice a day (Rath and Sinha, 2005; Rath *et al.*, 2003). There were 5 replications in each experimental condition with 20 larvae. Buffer stocks for each experimental condition were maintained to compensate mortality. After completion of feeding treatment the mature larvae were allowed to spin the cocoon out door. The shell content was weighed after pupation in due course.

Data recorded were based on dry weight basis. The indices of growth, food consumption, digestion, and conversion efficiencies are followed as per Waldbauer (1968): relative growth rate (RGR) = P/TA , relative consumption rate (RCR) = E/TA , approximate digestibility (AD %) = $100(E - F)/E$, efficiency of conversion of ingested food (ECI %) = $100 P/E$, efficiency of conversion of digested food (ECD %) = $100 P/(E - F)$ (where, A = mean dry weight of larva during the feeding period, E = dry weight of food eaten, F = dry weight of feces produced, P = dry weight gain of larva, T = duration of feeding (days)).

Statistical analyses:

One way analysis of covariance (ANCOVA) using initial larval dry mass as the covariate was conducted on the data for ingestion, digestion, gain in body weight and final body weight. The covariate had no effect on these parameters. Utilization plots (Raubenheimer and Simpson, 1992, 1994) were applied for the data generated from nutritional index (AD, ECI, and ECD). The resultant slopes were not parallel and significantly different from zero showing the original ratios were not isometric. Then, adjusted nutritional indices were calculated by regressing the numerator variable against its denominator variable, and the derived slope was used as an unbiased estimate of the ratio (Sokal and Rohlf, 1981). All the data sets with significant *F* values in ANOVA were analyzed post hoc using Tukey's HSD test.

RESULTS

The results were depicted in Table I.

Growth and survival of larva:

Significant growth inhibition was observed in the larva under stress. The absolute growth and RGR tends to decline significantly in the V instar larvae experiencing stress. During development the weight increased continuously and the larvae attained maximum weight on 18th day in E0 (control) while the larvae under stress showed delay in attaining their maximum weight on 20th, 22nd, 23rd, 21st and 22nd day in E1, E2, E3, E4 and E5 respectively, and the observed daily fresh weight increase were 1075 mg, 911 mg, 677 mg, 814 mg and 1002 mg, respectively against 1501 mg in E0. The decline in average weight gain was least (20.4%) in E1 and highest (41.9%) in E3.

The recorded declines in RGR were in the order of 15.1%, 18.9%, 24.5%, 26.4% and 37.7% in E1, E5, E4, E2 and E3 respectively and were significant. There was a significant increase in instar duration except in E1. It was 21.6 days in control (E0) group, which upon applying stress extended to 22.8 (E1), 25.4 (E2), 26.8 (E3), 26.0 (E4) and 27.4 (E5) days.

Larval survival declined significantly in the larvae under stress, the lowest survivability was observed in E3 where only 30% survivability was seen against a control (E0) value of 67.6%. Though only 47.4% survival was recorded in E4 (uzi fly parasitized) till the end of the study, but soon 100% mortality in the lot was observed following successful emergence of the maggots from the host.

Nutritional parameter:

Food ingestion and digestion declined significantly in all the larvae upon experiencing stress (except digestion in E5). The observed decline in food ingestion was highest in E4 (40.9%) followed by E3, E2, E4 and the lowest was found in E1 (11.3%). On the contrary, decline in food digestion was observed to be the highest (40.3%) in E3 followed by E4 (38.6%), E2 (30.5%), E1 (21.5%) and E5 (4%). The average dry matter ingestion (2913 mg) in control (E0) tends to decline in larvae under stress to 2326 mg in E1, 1975 mg in E2, 1705 mg in E3, 1462mg in E4 and 2026 mg in E5; so also the daily average dry matter digestion decline to 780 mg, 628 mg, 512 mg, 575mg, and 883 mg respectively over control value of 1104 mg. The declines in the value of RCR were significant in all groups except in E1. In E0 (control), the RCR was 0.432 which declined to 0.410, 0.357, 0.345, 0.272 and 0.365 in E1, E2, E3, E4 and E5 respectively.

Food utilisation value suffers a set back on meeting challenges of stress. AD and ECI declined significantly in the larvae under food deprivation (E1, E2, and E3), while ECD did not change. Both ECI and ECD significantly increased (by 19.3% and 15.5% respectively) in E4 but AD remains unaffected. In contrast, microsporidian infection (E5) leads to a significant increase in AD (14.4%) but ECD declined significantly (18.4%), while ECI did not change.

Silk Production:

Silk production (as expressed as shell weight) in *A. mylitta* declined significantly in all experimental conditions. The decline level was in the order of E3 (50.9%) E4 (42.9%) E2 (40.2%) E5 (30.8%) E1 (23.2%).

DISCUSSION

The stress condition in *A. mylitta* larvae influences growth, development, feeding, digestion and overall conversion potential. Developmental period was extended when the larvae experiencing stress from 21.6 days in control (E0) group, to 22.8 (E1), 25.4 (E2), 26.8 (E3), 26.0 (E4) and 27.4 (E5) days.

Table I. Effect of different kinds of stress on instar duration, survivability, food ingestion and utilization, and silk production in *Antheraea mylitta* (dry weight basis).*Tableau I. Effet de différents types de stress sur la durée de l'âge, la capacité de survie, l'ingestion et l'utilisation de nourriture et la production de soie chez *Antheraea mylitta* (base matière sèche).*

Parameters / Paramètres		Experimental conditions / Conditions de l'expérience					
		E0	E1	E2	E3	E4	E5
Instar duration (days) <i>Durée de l'âge (jours)</i>	21.6 ± 1.7 ^a	22.8 ± 0.8 ^a (+5.55%)	25.4 ± 0.5 ^b (+17.59%)	26.8 ± 0.8 ^{bc} (+24.07%)	26.0 ± 1.9 ^{bc} (+20.37%)	27.4 ± 1.5 ^c (+26.85%)	
Feeding period (days) <i>Durée d'alimentation (jours)</i>	18.0 ± 0.7 ^a	20 ± 1.3 ^b (+11.11%)	22 ± 1.2 ^{cd} (+22.22%)	23.2 ± 1.3 ^c (+28.89%)	21.2 ± 1.3 ^d (+17.78%)	21.6 ± 1.5 ^d (+20.00%)	
Survival (%) <i>Survie (%)</i>	67.6 ± 4.2 ^a	58.0 ± 4.3 ^b (-14.20%)	47.0 ± 3.5 ^c (-30.47%)	30.0 ± 5.2 ^d (-55.62%)	47.4 ± 3.4 ^c (-29.88%)	53.2 ± 5.3 ^b (-21.30%)	
Final weight (wet weight, g) <i>Poids final (poids frais, g)</i>	39.2 ± 2.6 ^a	32.6 ± 1.7 ^b (-16.84%)	31.1 ± 2.0 ^{bd} (-20.66%)	26.7 ± 2.7 ^{cd} (-31.89%)	28.3 ± 1.7 ^d (-27.81%)	30.2 ± 1.9 ^{bd} (-22.96%)	
Food ingested (g) <i>Nourriture ingérée (g)</i>	52.44 ± 4.22 ^a	46.51 ± 0.93 ^b (-11.31%)	43.46 ± 1.00 ^{bd} (-17.12%)	39.55 ± 0.90 ^c (-24.58%)	30.99 ± 1.85 ^c (-40.90%)	43.76 ± 1.88 ^d (-16.55%)	
Food assimilated (g) <i>Nourriture assimilée (g)</i>	19.87 ± 1.66 ^a	15.60 ± 1.46 ^b (-21.49%)	13.82 ± 0.98 ^c (-30.45%)	11.87 ± 0.46 ^d (-40.26%)	12.19 ± 1.16 ^d (-38.60%)	19.07 ± 1.03 ^a (-4.03%)	
RCR	0.432 ± 0.039 ^a	0.410 ± 0.017 ^a (-5.09%)	0.357 ± 0.020 ^b (-17.36%)	0.345 ± 0.007 ^b (-20.14%)	0.272 ± 0.020 ^c (-37.04%)	0.365 ± 0.061 ^b (-15.51%)	
Gain in body weight (g) <i>Gain en poids (g)</i>	6.49 ± 0.38 ^a	5.16 ± 0.33 ^b (-20.49%)	4.81 ± 0.25 ^{bc} (-25.89%)	3.77 ± 0.32 ^d (-41.91%)	4.61 ± 0.17 ^c (-28.97%)	5.10 ± 0.40 ^b (-21.42%)	
RGR	0.53 ± 0.006 ^a	0.045 ± 0.003 ^b (-15.09%)	0.039 ± 0.001 ^{bc} (-26.42%)	0.033 ± 0.002 ^c (-37.74%)	0.040 ± 0.002 ^b (-24.53%)	0.043 ± 0.008 ^b (-18.87%)	
AD%	38.08 ± 4.18 ^a	33.58 ± 3.58 ^b (-11.82%)	31.81 ± 2.24 ^b (-16.47%)	30.03 ± 1.11 ^b (-21.14%)	39.34 ± 5.59 ^a (+3.30%)	43.57 ± 2.06 ^c (+14.42%)	
ECI	12.46 ± 1.56 ^a	11.05 ± 0.88 ^b (-11.32%)	11.07 ± 0.69 ^b (-11.16%)	9.52 ± 0.64 ^c (-23.60%)	14.87 ± 1.17 ^d (+19.34%)	11.65 ± 0.48 ^a (-6.50%)	
ECD	32.74 ± 2.37 ^a	33.16 ± 1.31 ^a (+1.28%)	34.93 ± 1.70 ^a (+6.69%)	31.77 ± 2.21 ^a (-2.96%)	37.80 ± 3.02 ^c (+15.46%)	26.73 ± 2.10 ^b (-18.36%)	
Shell wt. (g) <i>Poids de la coque (g)</i>	2.24 ± 0.09 ^a	1.72 ± 0.08 ^b (-23.21%)	1.34 ± 0.06 ^c (-40.18%)	1.10 ± 0.06 ^d (-50.89%)	1.28 ± 0.10 ^c (-42.86%)	1.55 ± 0.15 ^f (-30.80%)	

Mean ± SD. Significant differences within parameter are indicated by different superscripts (ANOVA and Tukey's HSD test, $P < 0.05$). Figures in parentheses indicate change over control. / *Moyenne ± écart type. Les différences significatives entre les paramètres sont indiquées par les différents exposants (ANOVA et Test HSD de Tukey, $P < 0.05$). Les chiffres entre parenthèses indiquent le changement par rapport au témoin.*

Prolongation of feeding period become necessary when the larvae are under short supply of food either due to starvation or attack of parasites to fulfill the nutritional requirement to attain the intake target and growth targets which is obligatory for non-feeding stages of life cycle (Raubenheimer and Simpson, 1999). Significant growth inhibition was observed in the larva under stress and these were to the tune of 16.8% to 31.9%. The decline in weight gain was least (20.5%) in E1 and highest (41.9%) in E3. The decline in relative growth rate (RGR) was in the order of $E3 > E2 > E4 > E5 > E1$. Similar findings were already reported in other insects including sericigenous species (Mathavan and Muthukrishnan, 1976; Muthukrishnan *et al.*, 1978; Nath *et al.*, 1990 a, b; Schopf and Steinberger, 1996; Henn and Solter, 2000; Rath and Sinha, 2005; Rath *et al.*, 2000, 2003, 2004).

The survivability of *A. mylitta* larvae declined significantly upon experiencing stress, the lowest survival of 30.5% was observed in starved group E3 against the control (E0) value of 67.6%. The decline (37.2% over control) in survivability following food deprivation (6 hr/day) in *B. mori* further confirms our findings (Nath *et al.*, 1990b). The larvae under E4 could not survive beyond experimentation period following successful emergence of uzi maggots as reported earlier (Rath and Sinha, 2005).

Food utilisation value suffers a set back on meeting challenges of stress. Approximate digestibility (AD) in *Nosema* sp. infected (E5) larvae increased significantly, whereas, food deprivation (E1, E2 and E3) cause a significant decline but in the uzi infested larvae (E4) it remains with little change. The ECI value declined significantly in larvae suffered from food deprivation (E1, E2, and E3) but this was not true for larvae suffering from parasitic attack. Highest decline was observed in E3 (23.6%) and lowest in E5 (6.5%). An increase in ECI was observed in E4. However, the observed ECD values in different food deprivation experiments (E1, E2 and E3) did not differ statistically over control, whereas, stress conditions caused by parasitic invasion (E4 and E5) had recorded significant changes in their ECD (by +15.5% and -18.4% respectively).

The decline in values of RCR, RGR, AD and ECI obtained in *A. mylitta* upon food deprivation (E1, E2 and E3) were in conformity with earlier findings (Soo Hoo and Fraenkel, 1966; Slansky and Scriber, 1985; Nath *et al.*, 1990b, Rath *et al.*, 2004). Decline in RCR followed by declined food utilisation efficiency due to parasitisation resulted in reduced growth rate. Food consumption and digestibility were affected in *B. mori* upon parasitisation by uzi fly (Srikanth *et al.*, 1988; Nath *et al.*, 1990a) so also in *A. mylitta* (Rath *et al.*, 2000). Growth inhibition might be due to host parasitic interaction leading to metabolic changes in the host as reported in *B. mori* and other insects (Gordon and Webster, 1971; Dahlman and Vinson, 1980; Reddy *et al.*, 1992). Food utilisation efficiency has been found affected following parasitisation (Huebner and Chiang, 1982; Nath *et al.*, 1990a; Rath *et al.*, 2000). In *A. mylitta* the invasion of *Nosema* sp. in the fat body reduces food ingestion and assimilation but AD value increased significantly to compensate the nutrient requirement of the host. Such increased in AD value due to microsporidia infection are already reported in other insects (Bauer and Nordin, 1988; Henn and Solter, 2000). The decline in ECD value in *A. mylitta* following *Nosema* infection (E5) is further supported by the finding in the spruce bud worm (Bauer and Nordin, 1988). The decline in AD value due to short supply of food (conditions prevailing in E1, E2 and E3) enable the larvae to convert the digested food more efficiently (*i.e.*, ECD) which were found to be marginally increased by 1.3% in E1 and 6.7% in E2 and marginally declined by 3.0% in E3 over control (E0). Such increased in ECD following food deprivation were reported in *B. mori* (Nath *et al.*, 1990b).

Silk production (as expressed as shell weight) in *A. mylitta* declined significantly in all experimental conditions. The decline level were in the order of $E3 (50.9\%) > E4 (42.9\%) > E2 (40.2\%) > E5 (30.8\%) > E1 (23.2\%)$. Increase in the period of food deprivation as in E1, E2 and E3 decreases the shell content in *A. mylitta* further confirms the findings in *B. mori* (Muthukrishnan *et al.*, 1978). The lower amount of food intake by the larvae under stress ultimately affects the silk production (Muthukrishnan *et al.*, 1978; Nath *et al.*, 1990 a, b; Rath *et al.*, 2000).

Thus the overall stress condition leads to a decline in food intake followed by digestion and food utilisation efficiency which resulted in decline in growth rate and overall gain in body weight leading to poor silk production. The stress condition also limits the survivability of the larvae.

REFERENCES

- BAUER L. S. & NORDIN G. L. (1988) Nutritional physiology of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*, infected with *Nosema fumiferanae*, and interaction with dietary nitrogen. *Oecologia* (Heidelberg) 77: 44-50.
- DAHLMAN D. L. & VINSON S. B. (1980) Glycogen content in *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes*. *Comp. Bioch. Physiol.* 66: 625-630.
- GORDON R. & WEBSTER, J. M. (1971) *Mermis nigrescens*: Physiological relationship with its host, the adult desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Exp. Parasitol.* 29: 66-79.
- HENN M. W. & SOLTER L. F. (2000) Food utilization values of gypsy moth *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae infected with microsporidium *Vairimorpha* sp. (Microsporidia: Burenellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 76 (4): 263-269.
- HUEBNER LEONARD B. & CHIANG H. C. (1982) Effect of parasitism by *Lixophaga dieatraeae* (Diptera: Tachinidae) on food consumption and utilization of European corn borer larvae (Lepidoptera: Pyraustidae). *Envir. Entomol.* 11(5): 1053.
- MATHAVAN S. & MUTHUKRISHNAN J. (1976) Effects of ration levels and restriction of feeding duration of food utilisation in *Danaus chrysippus* (Lepidoptera: Danaidae). *Entomol. exp. Appl.* 155-162.
- MUTHUKRISHNAN J., MATHAVAN, S. & NAVARATHINA JOTHI V. (1978) Effect of restriction of the feeding duration on food utilisation, emergence and silk production in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae). *Monitor, Zool. Ital. (N. S.)* 12: 87-94.
- NATH T. N., BISWAS, S. N., SEN, S. K. & SUBBA RAO, G. (1990a) Effect of consumption, digestion and utilization of food in larvae of silkworm, *Bombyx mori* Linn. due to parasitism by uzi fly, *Tricholyga bombycis* Beck. *Indian J. Seric.* 29(1): 8-12.
- NATH T. N., SHIV NATH, SHAMSUDDIN M. & SUBBA RAO G. (1990b) Effect of food deprivation on dry matter utilization, shell and cocoon weight and fecundity of multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. Race Nistari. *Indian J. Seric.* 29(2): 174-181.
- RATH S. S. (2000) Studies on growth and development of *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) fed on three different natural food plants. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* 5: 99-103.
- RATH S. S. & SINHA B. R. R. P. (2005) Parasitization of fifth instar tasar silkworm, *Antheraea mylitta*, by uzi fly, *Blepharipa zebina*; a host-parasitoid interaction and its effect on host's nutritional parameters and parasitoid development. *J. Invertebr. Pathol.* 88: 70-78.
- RATH S. S., PRASAD B. C. & SINHA B. R. R. P. (2003) Food utilization efficiency in fifth instar larvae of *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae) infected with *Nosema* sp. and its effect on reproductive potential and silk production. *J. Invertebr. Pathol.* 83(1): 1-9.
- RATH S. S., SINGH B. M. K. & SINHA B. R. R. P. (2000) Effect of uzi parasitism on nutritional parameters and silk production in *Antheraea mylitta* D. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* 5: 179-188.
- RATH S. S., SINGH M. K. & SURYANARAYANA, N. (2006) Change in rate of feeding and assimilation in *Antheraea mylitta* fed on two major food plants and its effect on silk production and reproduction. *Agric. J. (Medwell Online)* 1(1):24-27.
- RATH S. S., SINHA B. R. R. P. & THANGAVELU K. (2004) Nutritional efficiency in *Antheraea mylitta* D. during food deprivation. *Int. J. Indust. Entomol.* 9(1): 111-115.
- RAUBENHEIMER D. & SIMPSON, S. J. (1992) Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. *Entomol. exp. appl.* 62(3): 221-231.
- RAUBENHEIMER D. & SIMPSON, S. J. (1994) The analysis of nutrient budgets. *Functional Ecology* 8:783-791.
- RAUBENHEIMER D. & SIMPSON, S. J. (1999) Integrating nutrition: a geometrical approach. *Entomol. exp. Appl.* 91: 67-82.

- REDDY K. V. R., BENCHAMIN K. V. & REMADEVI O. K. (1992) Metabolic profile of the haemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* in response to parasitism by the uzi fly, *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae) during the final instar. *Sericologia* 32(2): 227-233.
- SCHOPF A. & STEINBERGER, P. (1996) The influence of the endoparasitic wasp *Glyptapanteles lipardis* (Hymenoptera: Braconidae) on the growth, food consumption, and food utilization of its host larva, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Eur. J. Entomol.* 93: 555-568.
- SLANSKY F. JR. (1980) Effect of food utilization on food consumption and reproductive allocation by adult milkweed bugs, *Oncopeltus fasciatus*. *J. Insect Physiol.* 26: 79-84.
- SLANSKY F. JR. & SCRIBER J. M. (1985) Food consumption and utilization. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 4, Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion" (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, Eds.), pp. 88-163, Pergamon Press, Oxford.
- SOKAL R. R. & ROHLF F. J. (1981) *Biometry*. W. H. Freeman, New York.
- SOO HOO C. F. & FRAENKEL, G. (1966) The consumption, digestion and utilization of food plants by a polyphagous insect, *Prodenia eridania* (Cramer). *J. Insect Physiol.* 12: 711-730.
- SRIKANTH JR., BASAPPA H. & LINGAPPA S. (1988) Effect of uzi parasitisation on food consumption and growth of mulberry silkworm, *B. mori*. *Insect Sci. Applic.* 9: 373-379.
- VINSON S. B. (1972) Effect of parasitoid, *Campoletis sonorensis* on the growth of its host, *Heliothis virescens*. *J. Insect Physiol.* 18: 1509-1514.
- VINSON S. B. & BARRAS D. J. (1970) Effect of parasitoid *Cardiochiles nigriceps* on the growth development and tissues of *Heliothis virescens*. *J. Insect Physiol.* 16: 1329-1338.
- WALDBAUER G. P. (1968) The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.* 5: 229-288.

EFFET DU STRESS SUR LA CROISSANCE ET L'EFFICACITE D'UTILISATION DE LA NOURRITURE ET SUR LA PRODUCTION DE SOIE CHEZ LES LARVES DU CINQUIEME AGE D'*ANTHERAEA MYLITTA* (LEPIDOPTERE : SATURNIDAE)

S. S. RATH

Central Tasar Research & Training Institute, Piska Nagri – 835 303, Ranchi, Jharkhand, Inde.
E-mail : ssrathlee@rediffmail.com, ssrathlee@hotmail.com

*On a placé des larves d'*Antheraea mylitta* du cinquième âge dans des conditions expérimentales de stress pour évaluer l'effet sur la durée des âges, la capacité de survie, l'efficacité d'utilisation de la nourriture, la croissance et la production de soie. Les différentes conditions de stress dans lesquelles on les place sont l'absence de nourriture pendant 4 hr (E1), 8 hr (E2) et 12 hr (E3) et le parasitisme par la mouche *uzi* (E4) et par *Nosema* sp. (E5). Dans des conditions de stress, la durée larvaire est prolongée de 1,2 à 5,8 jours et la capacité de survie baisse considérablement, la plus faible étant celle des larves placées dans des conditions d'absence de nourriture pendant 12 heures (E3). L'absorption totale de nourriture baisse de 11,3 % à 40,9 %, suivi par un déclin de la digestion de 4 % à 40,3 %. Le taux de consommation relative (RCR) baisse dans les conditions de stress, le taux de consommation le plus faible étant observé chez les larves infestées par la mouche *uzi* (E4), qui enregistrent un déclin du taux de croissance de 15,1 % à 37,7 %. L'efficacité d'utilisation de la nourriture (AD, ECI et ECD) est atteinte chez les larves placées dans des conditions de stress. Chez les larves infestées par *Nosema* sp. (E5), l'AD augmente considérablement, tandis qu'elle baisse chez les larves privées de nourriture (E1, E2 et E3). L'ECI augmente considérablement avec E4 mais baisse chez E1, E2 et E3. D'autre part, l'ECD ne change pas en cas de privation de nourriture (E1, E2 et E3) mais enregistre une augmentation significative par rapport au témoin avec E4 et baisse avec E5. La production de soie baisse de l'ordre de 23,2 à 50,9 % avec différents types de conditions de stress. Les résultats indiquent que le stress provoqué par une absence de nourriture pendant 12 heures (E3) entraîne les dégâts les plus importants et l'absence de nourriture pendant 4 heures (E4) les moins importants.*

INTRODUCTION

L'alimentation larvaire chez les insectes adultes qui ne se nourrissent pas est un processus actif et dynamique. La qualité et la quantité de nourriture consommée par les larves influencent le taux de croissance, la durée de développement, le poids final du corps, la survie et le potentiel de reproduction chez les insectes (Slansky et Scriber, 1985). La durée de développement augmente avec la diminution du métabolisme, suivie par une baisse de l'activité de reproduction, lors de la baisse de la quantité de nourriture dans la nature (Muthukrishnan et coll., 1978 ; Slansky, 1980 ; Nath et coll., 1990b ; Rath et coll., 2004). Les paramètres d'utilisation de la nourriture et la croissance sont affectés chez de nombreux insectes infestés par une microsporidie et par d'autres parasites (Vinson et Barras, 1970 ; Vinson, 1972 ; Slansky et Scriber, 1985 ; Bauer et Nordin, 1988 ; Nath et coll., 1990a ; Henn et Solter, 2000 ; Rath et Sinha, 2005 ; Rath et coll., 2000, 2003). On a signalé des études chez *Antheraea mylitta* sur la croissance, le développement et les aspects comparatifs de l'utilisation de nourriture et leur effet sur le caractère adulte en fonction des différentes plantes hôtes (Rath et coll., 2006 ; Rath, 2000). Bien souvent, les insectes ne réussissent pas à obtenir suffisamment de nourriture pour leur

développement à la suite de conditions physiologiques et écologiques hostiles (Raubenheimer et Simpson, 1999). Il conviendrait d'étudier le stress que rencontrent les larves dans la nature et son effet sur l'absorption et l'utilisation de nourriture, car il a un impact direct sur la croissance et sur la production de soie d'un insecte important sur le plan économique, tel qu'*A. mylitta*. Cette étude compare les différentes conditions de stress rencontrées par les larves *A. mylitta* pour évaluer leur effet sur l'absorption et l'utilisation de nourriture, sur la croissance larvaire et sur la production de soie.

MATERIELS ET METHODES

Insecte et évaluation biologique :

Pendant toute l'étude, on choisit les larves du 5^{ème} âge d'*Antheraea mylitta* Drury (Daba bivoltine) (Lépidoptère : Saturniidae) car on enregistre l'ingestion (environ 81 %) et l'assimilation (73 à 74 %) maximums de nourriture pendant cet âge avec une croissance record (Rath et coll., 2006) et on peut étudier correctement l'impact du stress. On élève les larves du ver à soie tassar *Antheraea mylitta* à l'extérieur dans leur habitat naturel sur la plante hôte *Terminalia tomentosa* (Rath, 2000 ; Rath et coll., 2006) jusqu'au 4^{ème} âge. Peu après la sortie de la 4^{ème} mue du 5^{ème} âge sélectionné, on transfère les larves (poids moyen de 11 g) à l'intérieur (temp. 22-24° C et 77 à 80 % d'HR et 11 L : 3 O).

Il y a six conditions expérimentales :

- E0 = Témoin (larves saines du 5^{ème} âge), alimentation continue
- E1, E2 et E3 = Larves saines du 5^{ème} âge soumises à une privation quotidienne de nourriture respectivement pendant 4, 8, 12h
- E4 (Parasitisme par la mouche uzi) = Des larves saines du 5^{ème} âge sont parasitées par la mouche uzi (*Blepharipa zebina* Walker, Diptère : Tachinidae) le premier jour, d'après la description de Rath et coll., 2000. On maintient un niveau de parasitisme de 5 œufs par larve
- E5 (Infestées par la microsporidie *Nosema* sp.) Larves du 5^{ème} âge infestées par *Nosema* ($1,065 \times 10^6$ spores / ml)

On nourrit les larves de tous les lots expérimentaux en fournissant une quantité suffisante de feuilles de *T. tomentosa* pre-pesées deux fois par jour (Rath et Sinha, 2005 ; Rath et coll., 2003). Il y a 5 répétitions dans chaque condition expérimentale avec 20 larves. On maintient des stocks tampons pour chaque condition expérimentale pour compenser la mortalité. Après l'arrêt du traitement de nourriture, on laisse les larves mûres filer les cocons à l'extérieur. On pèse la teneur en coque (richesse soyeuse) après la nymphose.

Les données enregistrées se basent sur un poids sec. On procède à la mesure des indices de croissance, de consommation de nourriture, d'efficacité de digestion et de conversion d'après Waldbauer (1968) : taux de croissance relatif (RGR) = P / TA , taux de consommation relatif (RCR) = E / TA , digestibilité approximative (% AD) = $100 (E - F) / E$, efficacité de conversion de la nourriture ingérée (% ECI) = $100 P / E$, efficacité de conversion de la nourriture digérée (% ECD) = $100 P / (E - F)$ (où, A = poids sec moyen des larves pendant la durée d'alimentation, E = poids sec de la nourriture consommée, F = poids sec des excréments produits, P = gain de poids sec des larves, T = durée d'alimentation (jours).

Analyses statistiques :

On réalise une analyse de covariance à un facteur (ANCOVA) en utilisant la masse sèche larvaire initiale comme covariable dans les données concernant l'ingestion, la digestion, le gain de poids corporel et le poids corporel final. La covariable n'a pas d'effet sur ces paramètres. On détermine les points d'utilisation (Raubenheimer et Simpson, 1992, 1994) pour les données générées à partir de l'indice nutritionnel (AD, ECI et ECD). Les pentes qu'on obtient ne sont pas parallèles et sont significativement différentes de zéro, ce qui montre que les ratios originaux ne sont pas isométriques. Puis, on calcule les indices nutritionnels ajustés en mesurant la régression de la variable du numérateur par rapport à son dénominateur et on utilise la pente obtenue comme une estimation impartiale du ratio (Sokal et Rohlf, 1981). On analyse tous les lots de données avec des valeurs F significatives pour l'ANOVA post hoc en utilisant le test HSD de Tukey.

RESULTATS

Les résultats sont présentés dans le Tableau I.

Croissance et survie des larves :

On observe une inhibition significative de la croissance chez les larves dans les conditions de stress. La croissance absolue et le RGR tendent à décliner considérablement chez les larves du 5^{ème} âge dans les conditions de stress. Pendant le développement, le poids augmente de manière continue et les larves atteignent le poids maximum le 18^{ème} jour avec E0 (témoin) tandis que les larves dans des conditions de stress présentent un retard pour atteindre leur poids maximum le 20^{ème}, le 22^{ème}, le 23^{ème}, le 21^{ème} et le 22^{ème} jour, respectivement avec E1, E2, E3, E4 et E5 et l'augmentation quotidienne du poids frais est de respectivement 1075 mg, 911 mg, 677 mg, 814 mg et 1002 mg contre 1501 mg avec E0. La baisse du gain de poids moyen est la moins importante (20,4 %) avec E1 et la plus élevée (41,9 %) avec E3.

Les baisses du RGR enregistrées se classent dans l'ordre 15,1 % ; 18,9 % ; 24,5 % ; 26,4 % et 37,7 % avec respectivement E1, E5, E4, E2 et E3 et sont significatives. Il y a une augmentation significative de la durée de l'âge sauf avec E1. Il est de 21,6 jours chez le groupe témoin (E0), qui lorsqu'on le place dans des conditions de stress s'étend à 22,8 (E1), 25,4 (E2), 26,8 (E3), 26,0 (E4) et 27,4 (E5) jours.

La survie des larves baisse considérablement dans des conditions de stress, la capacité de survie la plus faible étant observée avec E3 où on n'observe que 30 % de capacité de survie contre une valeur de 67,6 % pour le témoin (E0). Bien qu'on enregistre une survie de 47,4 % avec E4 (parasitées par la mouche uzi) jusqu'à la fin de l'étude, on observe ensuite 100 % de mortalité dans le lot, après l'émergence réussie des pupes de l'hôte.

Paramètres nutritionnels :

L'ingestion et la digestion de nourriture baissent considérablement chez toutes les larves rencontrant des conditions de stress (sauf pour la digestion avec E5). Le déclin observé pour l'ingestion de nourriture est le plus élevé avec E4 (40,9 %) suivi par E3, E2, E4 et le plus faible que l'on observe est avec E1 (11,3 %). A l'inverse, on observe le déclin de la digestion de la nourriture le plus élevé (40,3 %) avec E3, suivi par E4 (38,6 %), E2 (30,5 %), E1 (21,5 %) et E5 (4 %). L'ingestion moyenne de matière sèche (2913 mg) chez le témoin (E0) tend à baisser chez les larves subissant un stress en passant à 2326 mg avec E1, 1975 mg avec E2, 1705 mg avec E3, 1462 mg avec E4 et 2026 mg avec E5 ; comme le déclin de la digestion quotidienne moyenne de matière sèche qui passe à 780 mg, 628 mg, 512 mg, 575 mg et 883 mg respectivement par rapport à la valeur du témoin de 1104 mg. Les baisses de la valeur du RCR sont significatives dans tous les groupes sauf avec E1. Avec E0 (témoin), le RCR est de 0,432 et il passe à 0,410 ; 0,357 ; 0,345 ; 0,272 et 0,365 respectivement avec E1, E2, E3, E4 et E5.

La valeur d'utilisation de la nourriture subit une régression dans des conditions de stress. L'AD et l'ECI baissent considérablement chez les larves privées de nourriture (E1, E2 et E3), tandis que l'ECD ne change pas. L'ECI et l'ECD augmentent considérablement (respectivement de 19,3 % et 15,5 %) avec E4 mais l'AD n'est pas affectée. A l'inverse, l'infestation par la microsporidie (E5) entraîne une augmentation significative de l'AD (14,4 %) mais l'ECD baisse considérablement, (18,4 %), tandis que l'ECI ne change pas.

Production de soie :

La production de soie (exprimée d'après le poids de la coque) baisse considérablement chez *A. mylitta* dans toutes les conditions expérimentales. Le niveau de baisse se classe dans l'ordre E3 (50,9 %), E4 (42,9 %), E2 (40,2 %), E5 (30,8 %) et E1 (23,2 %).

DISCUSSION

Les conditions de stress chez les larves *A. mylitta* influencent la croissance, le développement, l'alimentation, la digestion et le potentiel général de conversion. La période de développement est prolongée quand les larves subissent un stress, allant de 21,6 jours chez le groupe témoin (E0) à 22,8 (E1), 25,4 (E2), 26,8 (E3), 26,0 (E4) et 27,4 (E5) jours.

Le prolongement de la durée d'alimentation devient nécessaire quand les larves ont un apport restreint de nourriture à cause de la faim ou de l'attaque par les parasites afin de répondre aux besoins nutritionnels pour atteindre la cible d'absorption et les objectifs de croissance, ce qui est obligatoire pour les étapes sans alimentation du cycle de vie (Raubenheimer et Simpson, 1999). On observe une inhibition significative de la croissance chez les larves subissant un stress et elle est de l'ordre de 16,8 à 31,9 %. Le déclin du gain de poids est le moins important (20,5 %) avec E1 et le plus élevé (41,9 %) avec E3. La baisse du taux de croissance relative (RGR) se situe dans l'ordre E3 > E2 > E4 > E5 > E1. On a déjà rapporté des observations similaires chez d'autres insectes y compris chez les espèces séricigènes (Mathavan et Muthukrishnan, 1976 ; Muthukrishnan, et coll., 1978 ; Nath et coll., 1990a, b ; Schopf et Steinberger, 1996 ; Henn et Solter, 2000 ; Rath et Sinha, 2005 ; Rath et coll., 2000, 2003, 2004).

La capacité de survie des larves *A. mylitta* baisse considérablement lorsqu'elles rencontrent des conditions de stress, la survie la plus faible que l'on observe étant de 30,5 % chez le groupe affamé E3 contre la valeur de 67,6 % pour le témoin (E0). La baisse (37,2 % par rapport au témoin) de la capacité de survie suite à la privation de nourriture (6 hr / jour) chez *B. mori* confirme nos observations (Nath et coll., 1990b). Les larves du traitement E4 ne peuvent pas survivre au-delà de la période d'expérimentation suite à l'émergence réussie des vers uzi comme on l'a déjà rapporté (Rath et Sinha, 2005).

La valeur d'utilisation de la nourriture subit une régression dans des conditions de stress. La digestibilité approximative (AD) chez les larves infestées par *Nosema* sp. (E5) augmente considérablement, tandis que la privation de nourriture (E1, E2 et E3) entraîne une baisse significative mais chez les larves infestées par la mouche uzi (E4) elle subit peu de changement. La valeur ECI baisse considérablement chez les larves subissant une privation de nourriture (E1, E2 et E3), mais cela n'est pas vrai pour les larves qui subissent une attaque par les parasites. On enregistre la baisse la plus élevée avec E3 (23,6 %) et la plus faible avec E5 (6,5 %). On enregistre une augmentation de l'ECI avec E4. Cependant, les valeurs ECD que l'on observe avec les différentes expériences de privation de nourriture (E1, E2 et E3) ne diffèrent pas du témoin sur le plan statistique, tandis que les conditions de stress provoquées par l'invasion par le parasite (E4 et E5) provoquent des changements significatifs de leur ECD (respectivement +15,5 % et - 18,4 %).

La baisse des valeurs RCR, RGR, AD et ECI obtenue chez *A. mylitta* lors de la privation de nourriture (E1, E2 et E3) est conforme aux observations précédentes (Soo Hoo et Fraenkel, 1966 ; Slansky et Scriber, 1985 ; Nath et coll., 1990b ; Rath et coll., 2004). La baisse du RCR suivie par la

baisse de l'efficacité d'utilisation de nourriture provoquée par le parasitisme entraîne la diminution du taux de croissance. La consommation de nourriture et la digestibilité sont atteintes chez *B. mori* lors du parasitisme par la mouche uzi (Srikanth et coll., 1988 ; Nath et coll., 1990a) et c'est la même chose chez *A. mylitta* (Rath et coll., 2000). L'inhibition de la croissance pourrait être due à l'interaction hôte / parasite, ce qui entraîne des changements métaboliques chez l'hôte, comme on l'a signalé chez *B. mori* et chez d'autres insectes (Gordon et Webster, 1971 ; Dahlman et Vinson, 1980 ; Reddy et coll., 1992). L'efficacité d'utilisation de la nourriture est affectée suite au parasitisme (Huebner et Chiang, 1982 ; Nath et coll., 1990a ; Rath et coll., 2000). Chez *A. mylitta*, l'invasion du corps gras par *Nosema* sp. diminue l'ingestion et l'alimentation de nourriture, mais la valeur AD augmente considérablement pour compenser le besoin en nutriments de l'hôte. On a déjà signalé une augmentation de ce type à cause de l'infestation par des microsporidies chez d'autres insectes (Bauer et Nordin, 1988 ; Henn et Solter, 2000). La baisse de la valeur ECD chez *A. mylitta* suite à l'infestation par *Nosema* (E5) est confirmée par les observations chez le ver du bourgeon de l'épicéa (Bauer et Nordin, 1988). La baisse de la valeur AD provoquée par une diminution de l'apport de nourriture (conditions des traitements E1, E2 et E3) permet aux larves de convertir la nourriture digérée plus efficacement (c'est-à-dire l'ECD), qui s'avère augmenter de manière marginale de 1,3 % avec E1 et de 6,7 % avec E2 et baisse de manière marginale de 3 % avec E3 par rapport au témoin (E0). On a déjà signalé une augmentation de l'ECD de ce type suite à une privation de nourriture chez *B. mori* (Nath et coll., 1990b).

La production de soie (exprimée d'après le poids de la coque) chez *A. mylitta* baisse de manière significative dans toutes les conditions expérimentales. Le niveau de baisse est dans l'ordre E3 (50,9 %) > E4 (42,9 %) > E2 (40,2 %) > E5 (30,8 %) > E1 (23,2 %). L'augmentation de la période d'absence de nourriture avec E1, E2 et E3 diminue la richesse soyeuse d'*A. mylitta*, ce qui confirme d'avantage les observations chez *B. mori* (Muthukrishnan et coll., 1978). La quantité plus faible d'absorption de nourriture par les larves dans des condition de stress a un effet en fin de compte sur le production de soie (Muthukrishnan et coll., 1978 ; Nath et coll., 1990a, b ; Rath et coll., 2000).

Les conditions générales de stress entraînent une baisse de l'absorption de nourriture, suivie par une baisse de la digestion et l'efficacité d'utilisation de la nourriture, qui débouchent sur une baisse du taux de croissance et du gain général de poids corporel, ce qui engendre une mauvaise production de soie. Les conditions de stress limitent aussi la capacité de survie des larves.

POSITIVE INFLUENCE OF PHYLLOPLANE MICRO FLORA ON GUT MICRO FLORA AND GROWTH AND DEVELOPMENT OF INDIAN SILKWORM BREEDS

P. MOHANRAJ, S. SUBRAMANIAN* & M. MUTHUSWAMI

Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore – 641 003, India.

Studies have been carried out on association of phylloplane micro flora with the gut micro flora and their role on growth and development of silkworm breeds. The phylloplane bacterial population recorded on four Indian mulberry varieties viz., MR2, Kanva 2, V1 and DD revealed that the highest bacterial population of 2.0×10^7 cfu/g was observed in MR2, followed by Kanva 2 and V1 while, the lowest population was recorded in DD (1.7×10^7 cfu/g). Influence of mulberry varieties on gut micro flora was studied by following through gut microflora population in two silkworm breeds viz., Pure Mysore and CSR 2 reared on the chosen mulberry varieties. The variety, MR2 accounted for significantly higher gut bacterial flora of 2.82×10^7 cfu/g and 2.65×10^7 cfu/g respectively in CSR 2 and Pure Mysore races. Observations have shown that *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp. and *Enterobacter cloacae* were some of the bacterial strains commonly inhabiting the phylloplane of mulberry varieties as well as the gut of silkworm breeds. The phylloplane microflora of mulberry varieties had significant influence on the growth and economic parameters of silkworm breeds with the variety MR2 accounting for significantly higher larval weight, shell weight and shell ratio in comparison to other races evaluated.

Keywords: Silkworm, Indian breeds, gut microflora, *Bombyx mori*, bacteria, actinomycetes

INTRODUCTION

The term 'phyllosphere' indicates micro – environment conditioned by the leaf (Ruinen, 1956). Phyllosphere microbes have been isolated from several crop species including cotton (Singh *et al.*, 1984) and wheat (Bharat, 1969). Phylloplane microflora of mulberry has been enumerated by several earlier workers (Takahashi *et al.*, 1995, Watanabe *et al.*, 1998 and Neelu Nangia *et al.*, 1999). Sukumar and Ramalingam (1986) working on phylloplane microflora of Indian mulberry varieties revealed that maximum bacterial flora was found on the upper leaf surface. A natural bacterial flora occurs in the gut of silkworm breeds (Iwanami and Ono, 1963; Takizawa and Lizuka, 1968; Iizuka and Takizawa, 1969, Steinhaus, 1963). In the present study, phylloplane microflora of popular Indian mulberry varieties viz., V1, Kanva 2, MR 2 and DD (Viswa) have been enumerated. Their influence on gut microflora and growth and development of silkworm breeds has been investigated.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection:

The present investigation was carried out to ascertain the phyllosphere microflora of four Indian mulberry varieties viz., V1, Kanva2, MR2, and DD. The mulberry leaves sampled from top, middle

* Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore.

and bottom of 10 plants selected randomly were collected in sterile polythene covers separately and brought to the laboratory. From each leaf, five discs (2.0 cm) were cut out using punch cork and placed in sterile water (100 ml) immediately and stirred for 30 minutes.

Isolation of phylloplane microflora:

Succulent disease free leaves from above mentioned varieties were selected and kept separated. Phylloplane microflora was investigated in order to find out the source of microbes in the silkworm gut. Spread plate technique (Robert, 1967) was followed to enumerate microbial population. Enumeration of bacterial flora was done using Nutrient agar media (Beef Extract 3.0 g, Peptone 5.0 g, Sodium Chloride 8.0 g, Agar 15.0 g).

Maintenance of silkworm breeds:

The healthy mulberry leaves of variety - V1, Kanva2, MR2, DD, were fed to the silkworm breeds i.e. Pure Mysore and CSR2 obtained from disease free layings. The silkworm breeds were grown in rearing room under hygienic conditions with optimum temperature (25-28°C) and relative humidity (60-70%). The leaf feeding was given 3-4 times a day after hatching. Silkworm larvae from respective varieties were reared for extraction of gut, enumeration of microflora and for recording growth and development parameters viz., cocoon weight, shell weight and shell ratios.

Isolation of gut microflora:

For isolation of gut microflora, two day old healthy 5th instar larvae were selected and kept under starvation for 4-6 hours at an optimum temperature (26-28°C) and relative humidity (60-70%) prior to dissection. Larvae were surface sterilized with alcohol and dissection was carried out under sterile conditions. After isolation, the guts were homogenized immediately in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). Gut homogenates were then transferred to vials and kept at 5°C for several hours to overnight before washing three times with glutaraldehyde-free phosphate buffer (Breznak and Pankratz, 1977). Spread plate technique (Robert, 1967) was followed to enumerate bacterial population in the gut using nutrient agar media.

Statistical analysis:

The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) test. Correlation analysis was done to ascertain the relation of gut bacterial load with silkworm economic parameters.

RESULTS

Enumeration of phylloplane microflora:

Phylloplane microflora enumerated from the mulberry varieties is presented in Table I. Significant difference in phylloplane microflora load could be observed among the mulberry varieties screened. The phylloplane bacterial load of the mulberry varieties was in the range of 1.78 to 2.01 $\times 10^7$ cfu/g. Among the mulberry varieties MR2 registered significantly the highest bacterial load 2.01 $\times 10^7$ cfu/g followed by V1 (1.83 $\times 10^7$ cfu/g) and Kanva 2 (1.82 $\times 10^7$ cfu/g) which were however on par.

The common phylloplane bacterial flora enumerated includes *Enterobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus* sp. The common gut bacterial flora enumerated includes *Bacillus subtilis*, *E.coli*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *E.clocae* and *Micrococcus* sp.

Table I. Enumeration of phyloplane bacterial flora on mulberry varieties.*Tableau I. Énumération de la flore bactérienne du phyloplane chez les variétés de mûrier.*

Sl. No	Mulberry varieties	Bacterial count
<i>No. de série</i>	<i>Variétés de mûrier</i>	<i>Compte en bactéries</i> ($\times 10^7$ cfu/g)
1	MR2	$2.01 \pm 0.18_a$
2	Kanva2	$1.82 \pm 0.12_b$
3	V1	$1.83 \pm 0.16_b$
4	DD	$1.78 \pm 0.24_b$
	CD at 5%	0.17

The means followed by same letter are not statistically different at $P = 0.05$ *Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas statistiquement différentes à $P = 0,05$.***Table II. Role of mulberry varieties on gut microflora of silkworm races, PM and CSR2.***Tableau II. Influence des variétés de mûrier sur la microflore de l'intestin des races de ver à soie, PM et CSR2.*

Mulberry varieties	Bacteria count / <i>Compte en bactéries</i> ($\times 10^7$ cfu/g)	
<i>Variétés de mûrier</i>	PM	CSR 2
MR2	$2.65 \pm 0.12_{2a}$	$2.82 \pm 0.14_{1a}$
Kanva2	$2.42 \pm 0.14_{2b}$	$2.68 \pm 0.18_{1b}$
V1	$2.46 \pm 0.14_{2b}$	$2.66 \pm 0.16_{1b}$
DD	$2.45 \pm 0.10_{2b}$	$2.59 \pm 0.12_{1b}$
Mean / <i>Moyenne</i>	2.49	2.69
CD at 5% L*	0.17	0.12
V*	0.23	0.21

L* - Races, V* - Mulberry varieties / *Variétés de mûrier*.

Numbers indicate comparison of races; Alphabets show comparison of variety.

*Les nombres montrent les comparaisons entre les races ; les lettres montrent les comparaisons entre les variétés.*The means followed by same letter and numbers are not statistically different at $P = 0.05$ *Les moyennes suivies par les mêmes lettres et nombres ne sont pas statistiquement différentes à $P = 0,05$.*

Table III. Effect of mulberry varieties on economic parameters of silkworm races, PM and CSR2.

Tableau III. Effet des variétés de mûrier sur les paramètres économiques des races de ver à soie, PM et CSR2.

Pure Mysore					
Mulberry variety	Gut Bacteria ($\times 10^7$ cfu/g)	Larval weight (g)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)
Variété de mûrier	Bactéries de l'intestin ($\times 10^7$ cfu/g)	Poids larvaire (g)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)
MR 2	2.65 $\pm$ 0.12 _a	2.56 $\pm$ 0.10 _a	1.28 $\pm$ 0.06 _a	0.25 $\pm$ 0.08 _a	19.5 $\pm$ 0.12 _a
Kanva 2	2.42 $\pm$ 0.14 _b	2.35 $\pm$ 0.08 _b	1.24 $\pm$ 0.04 _b	0.23 $\pm$ 0.06 _b	18.50 $\pm$ 0.08 _a
V1	2.46 $\pm$ 0.14 _b	2.45 $\pm$ 0.06 _b	1.21 $\pm$ 0.04 _c	0.23 $\pm$ 0.04 _b	19.00 $\pm$ 0.10 _a
DD	2.45 $\pm$ 0.10 _b	2.42 $\pm$ 0.08 _b	1.23 $\pm$ 0.06 _b	0.21 $\pm$ 0.02 _c	17.30 $\pm$ 0.14 _b
CD at 5 %	0.23	0.13	0.01	0.01	0.10
Correlation coefficient (r)		0.8904	0.6931	0.6079	0.4179
Coefficient of correlation (r)					
Coefficient of determination (r^2)		0.9436	0.8325	0.7797	0.6464
Coefficient of determination (r^2)					
CSR 2					
Mulberry variety	Gut bacteria ($\times 10^7$ cfu/g)	Larval weight (g)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell Ratio (%)
Variété de mûrier	Bactéries de l'intestin ($\times 10^7$ cfu/g)	Poids de la larve (g)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)
MR 2	2.82 $\pm$ 0.14 _a	2.67 $\pm$ 0.12 _a	1.32 $\pm$ 0.06 _a	0.29 $\pm$ 0.02 _a	22.00 $\pm$ 0.16 _a
Kanva 2	2.68 $\pm$ 0.18 _b	2.43 $\pm$ 0.08 _b	1.30 $\pm$ 0.05 _a	0.28 $\pm$ 0.04 _a	21.50 $\pm$ 0.10 _b
V1	2.66 $\pm$ 0.16 _b	2.51 $\pm$ 0.06 _b	1.28 $\pm$ 0.04 _b	0.28 $\pm$ 0.05 _a	21.80 $\pm$ 0.12 _b
DD	2.59 $\pm$ 0.12 _c	2.41 $\pm$ 0.08 _b	1.27 $\pm$ 0.02 _b	0.26 $\pm$ 0.08 _b	20.00 $\pm$ 0.10 _c
CD at 5 %	0.22	0.14	0.02	0.02	0.32
Correlation coefficient (r)		0.8523	0.9124	0.9000	0.6065
Coefficient of correlation (r)					
Coefficient of determination (r^2)		0.9232	0.9552	0.9000	0.7788
Coefficient of determination (r^2)					

The means followed by same letter are not statistically different at $P = 0.05$ / Les moyennes que suivent la même lettre ne sont pas différentes sur le plan statistique au seuil de $P = 0,05$.

Correlation analyses were done between gut bacterial population Vs economic parameters / On procède aux analyses de corrélation entre la population bactérienne de l'intestin et les paramètres économiques.

Mulberry varieties vis-à-vis gut bacteria:

Distinct differences in gut bacterial population of silkworm breeds were noticed (Table II). Among the mulberry varieties screened, MR2 recorded significantly higher gut bacterial load of 2.82×10^7 cfu/g and 2.65×10^7 cfu/g respectively in CSR2 and PM races. Next to MR2, the varieties Kanva 2, DD and V1 supported gut bacterial flora to the tune of 2.42×10^7 cfu/g to 2.68×10^7 cfu/g. Among the breeds evaluated, CSR2 registered comparatively higher gut bacterial load than PM.

Gut bacteria vis-à-vis silkworm economic parameters:

Observations on silkworm economic parameters like larval weight, cocoon weight, shell weight and shell ratio were recorded in the silkworm breeds reared separately on four mulberry varieties viz., Kanva 2, MR2, DD and V1. Influence of gut microflora load on silkworm economic parameters was assessed by correlation studies. Results of the correlation study are presented in table III. The values of r^2 (coefficient of determination) reflect the extent of variability exerted by gut microflora on different economic parameters.

Comparison of r^2 values shows that the economic parameters viz., larval weight, cocoon weight, shell weight and shell ratio of CSR 2 were positively influenced by gut bacterial population with the values of r^2 ranging from 60.65 to 91.24 per cent for these economic parameters. Whereas, in Pure Mysore, the gut bacterial load positively influenced the larval weight, cocoon weight and shell weight but not the shell ratio. Comparison of coefficient of determination between the two pure races reveals the greater influence of gut microflora load on silkworm economic parameters in CSR2 than in Pure Mysore.

DISCUSSION**Phylloplane microflora:**

The phylloplane microflora enumerated from four mulberry varieties viz., MR2, Kanva 2, V1 and DD (Table I) revealed that the variety, MR2 registered the highest phylloplane bacterial load of 2.01×10^7 cfu/g followed by V1 (1.83×10^7 cfu/g) and Kanva2 (1.82×10^7 cfu/g). Differences in gut microflora load of silkworm races reared on different mulberry varieties were earlier recorded by Neelu Nangia *et al.* (1999). The phyllosphere microflora remains as a major source of gut microflora for majority of herbivorous insects. The microbiota of grasshopper, *Schistocerca gregaria* is dominated by the phyllosphere microflora of their grass habitats (Dillon and Dillon, 2004). The mulberry variety, MR2 probably might have provided the better niche for the colonization of phyllosphere microflora, than other varieties.

Mulberry varieties vis-à-vis gut microflora:

The comparison of gut bacterial population of pure races PM and CSR 2 is given along with their food plants in Table II. From the Table, it is possible to notice that the gut bacterial load was significantly higher in silkworm races, PM and CSR2 when reared on MR2 leaves, than on other varieties. The relative differences in gut bacterial load of the silkworm breeds could be attributed to their host plants as the food plant serves as a dominant source for microflora of insects. Although the varieties, V1 and MR2 have relatively higher nutritive values than other varieties under study, the exact factors responsible for supporting higher gut bacterial load in silkworms reared on MR2 needs to be investigated. It might be probable that there are some common bacterial flora that inhabit both the phyllosphere of MR2 as well the silkworm gut environments.

Mulberry varieties vis-à-vis growth and development:

The present study attempts to explore the positive influence of phylloplane microflora on the beneficial gut microflora of silkworm and its impact on the silkworm economic parameters (Table III). The positive correlation of gut microflora load with the silkworm economics parameters like larval

weight, cocoon weight and shell weight reflected by higher values of coefficient of determination underscored the positive influence of gut microflora on the growth and development of silkworm.

The nutritional contribution of gut microflora in silkworm has well been documented in earlier studies. Bosticco and Arnaudo (1955) speculated the role of gut actinomycetes as a source for synthesis of vitamin B12 in silkworms. Kalpana *et al.*, (1999) studied the role of gut bacterial isolates on silkworm nutrition. It was observed that a great majority of such isolates was protease producers followed by lipid and polysaccharides splitters. The bacteria inhabiting the gut of silkworm were found to be elaborating amylase, caseinase, gelatinase, lipase and urease. Considering the higher demand of protein in later stages of silkworm the role of gut bacteria is emphasized more in elaborating the mulberry leaf proteins. Hence it can be deduced that MR2, a variety with high protein content (20-22%) might be favourable for the development of gut microflora load, which in turn positively influenced the feeding potential, and digestibility of silkworm larvae culminating in better growth and development parameters.

Phylloplane serves as a source for gut bacterial inoculum. Takahashi *et al.* (1995) reported that epiphytic bacteria *Erwinia herbicola* was commonly detected from mulberry leaves and mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis*. Watanabe *et al.*, (1998) observed that two genera of bacteria such as *E. herbicola* and *Staphylococcus* sp. were frequently detected in guts or faeces of silkworms feeding on mulberry leaves. Survival and growth tests of epiphytic inoculum in the gut of silkworm larvae established that *E. herbicola* multiplied in the silkworm guts six days after inoculation.

Enterobacter cloacae have frequently been detected in the phyllosphere of plants (Ladha *et al.*, 1983). Watanabe and Sato, 1998 reported the plant-insect inhabiting strains of *E. cloacae*. Watanabe *et al.* (1998) observed that the bacterium, *Staphylococcus* which is commonly found in the gut of various insects did not survive on mulberry leaves. But, Neelu Nangia *et al.*, (1999) found the presence of *Micrococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. on the phylloplane of Indian mulberry variety, M5. Colonization of phylloplane microflora in the gut of silkworm breeds suggests the presence of plant - insect inhabiting strains of select bacterial species. It is more probable to speculate that mulberry variety like MR2 is more amenable for growth of such bacterial strains. The positive association of phylloplane bacteria and silkworm gut bacteria is reflected well on the enhancement of silkworm economic parameters.

Phylloplane microflora vis-a-vis silkworm mortality:

About 5- 8% mortality due to the bacterial flacherie was recorded in the present study in the silkworm breeds. Preliminary examination of cadaver larvae indicated gross contamination of gut with several bacterial species. However, detailed studies were not undertaken on the cause of bacterial flacherie as well as pathogenicity of different bacterial isolates, as the focus of the study was on the positive influence of phylloplane microflora on the growth and development of silkworm.

CONCLUSION

The phyllosphere microflora is conditioned by the micro environment and the favourable niche available on the surface of leaves. Higher nutritive value coupled with the availability of suitable niche in the mulberry variety, MR2 might have influenced better colonization of phyllosphere microflora. Higher gut microbiota enumerated in the silkworm breeds reared on such varieties implied the presence of some common plant – insect inhabiting bacterial strains on mulberry leaf surface. Further, it could be deduced from the present study that the positive association of phyllosphere microflora with the gut microbiota is influencing the overall growth and development of silkworm. As leaves also serve as a source of contamination, it is prudent to isolate gut inhabiting strains of beneficial microflora from phylloplane of mulberry leaves which would find wider application in sericulture industry in the preparations of microbial consortia as a 'neutraceutical' to augment silkworm economic parameters.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the facilities provided by the authorities of Tamil Nadu Agricultural University in the conduct of the study. The help rendered by Dr. Raguchander and Dr. Sivakumar regarding the isolation of phylloplane of bacterial strains is greatly acknowledged.

REFERENCES

- BHARAT, S. D. (1969) The microbial flora of laboratory cultures of the greater wax moth and its effect on rearing parasites. *J. Invertebr. Pathol.* 9: 467-473.
- BREZNAK J. A., PANKRATZ H. S. (1977) *In situ* morphology of the gut microbiota of wood-eating termites (*Reticulitermes flavipes* and *Coptotermes formosanus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 406-426.
- BOSTICCO A., ARNAUDO M. (1995) Bio synthesis of insect gut microflora. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 8:272-275.
- DILLON R. J., DILLON V. M. (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Ann. Rev. Entomol.* 49: 71-92.
- GHOSH R. K. (1962) Studies on the normal alimentary flora of the silkworm larvae (*Bombyx mori* Linn.). *Indian J. Seric.* 16: 10-13.
- IIZUKA T., TAKIZAWA, Y. (1969) The aerobic bacterial flora in the gut of larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. (II) The bacterial flora of the larvae reared on the artificial diet. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 38:95-102.
- IWANAMI, S., ONO, M. (1963) Identification of bacteria isolated from gut juice of flacherie-diseased silkworms. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 7:26-30. [In Japanese with German summary]
- KALPANA, S., HATHA, A. M., SWAMY L. P (1999) Gut microflora of the larva of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science and its Application.* 15: 4- 5 & 99- 502.
- LADHA J.K., BARRAQUIO W.L., WATANABE I. (1983) isolation and identification of nitrogen fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Canadian J. Microbiol.* 29:1301-1308.
- NEELU NANGIA V., ASHOK KUMAR B., NAGESHCHANDRA, K. (1999) Gut microflora of healthy mulberry silkworm. *National Symposium of Trends in Sericulture*, Dept. of Sericulture, UAS, Bangalore, 247-244.
- ROBERT, P.H. (1967) *Experimental Microbiology Laboratory Guide*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 51.
- RUINEN, P. (1956) Etude sur la flore "mycosique" intestinal des abeilles soumises aux traitement aux antibiotiques et sulfathiazol. *Bull. Apicolu.* 9: 53-65.
- SINGH N., RANDHAWA P.S., KUMAR, B. (1984) Quantitative and qualitative bacterial flora of two cotton cultivars in relation to age of the crop and Environmental condition. *Indian J. Ecol.* 11:127-133.
- STEINHAUS A. E. (1963) *Insect Microbiology*. Matner Publishing Company. New York and London, 31.
- SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1986) Studies on the phylloplane microflora of mulberry I. Bacterial population on healthy leaves. *Sericologia*, 26: 535
- TAKAHASHI, K. (1955) Nutrition role in silkworm *Bombyx mori*. *J. agri. Chem., Soc Japan.* 29: 711-715.
- TAKAHASHI K., WATANABE K., SATO, M. (1995) Survival and characteristics of ice nucleation-active bacteria on mulberry trees (*Morus* spp.) and in mulberry pyralid (*Glyphodes pyloalis*). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61:439-443.
- TAKIZAWA Y., IIZUKA T (1968) The aerobic bacterial flora in the gut of larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. (I) The relation "Gene Transfer in the Environment" (S. A. Levy and R. V. Miller, Eds.), McGraw-Hill, New York. 261-285.

- WATANABE K., HARA W., SATO, M. (1998) Evidence for growth of strains of the plant epiphytic bacterium *Erwinia herbicola* and transconjugation among the bacterial strains in guts of the silkworm *Bombyx mori*. J.Inverteber Pathol. 72:104-111.
- WATANABE K., SATO M. (1998) Plasmid – mediated gene transfer between insect – resident bacteria, *Enterobacter cloacae* and plant epiphytic bacteria, *Erwinia herbicola*, in guts of silkworm larvae. Curr. Microbial.37:352-355.

INFLUENCE POSITIVE DE LA MICROFLORE DU PHYLLOPLANE SUR LA MICROFLORE DE L'INTESTIN ET SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DES LIGNEES DE VER A SOIE INDIENNES

P. MOHANRAJ, S. SUBRAMANIAN* & M. MUTHUSWAMI

Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore – 641 003, Inde.

*Des études ont été réalisées sur l'association entre la microflore du phylloplane et la microflore de l'intestin et sur leur rôle dans la croissance et le développement des lignées de ver à soie. On enregistre la population bactérienne du phylloplane chez quatre variétés de mûrier indiennes, c'est-à-dire MR2, Kanva2, V1 et DD et on observe la population bactérienne la plus élevée de $2,0 \times 10^7$ cfu / g chez MR2, suivie par Kanva 2 et V1 et la population la plus faible chez DD ($1,7 \times 10^7$ cfu/g). On a étudié l'influence des variétés de mûrier sur la microflore de l'intestin, en observant la population de la microflore chez deux lignées de ver à soie, Pure Mysore et CSR2 élevées sur des variétés de mûrier sélectionnées. La variété MR2 donne une flore bactérienne de l'intestin significativement plus élevée de respectivement $2,82 \times 10^7$ cfu / g et de $2,65 \times 10^7$ cfu / g chez les races CSR2 et Pure Mysore. Les observations montrent que *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp. et *Enterobacter cloacae* sont certaines des souches bactériennes qui habitent couramment le phylloplane des variétés de mûrier ainsi que l'intestin des vers à soie. La microflore du phylloplane des variétés de mûrier a une influence significative sur la croissance et les paramètres économiques des lignées de ver à soie et la variété MR2 donne un poids de larve, un poids de coque et une richesse soyeuse significativement plus élevés, par comparaison aux autres variétés évaluées.*

INTRODUCTION

Le terme « phyllosphère » indique le micro-environnement conditionné par la feuille (Ruinen, 1956). On a isolé les microbes de la phyllosphère chez plusieurs espèces de cultures y compris chez le coton (Singh et coll., 1984) et le blé (Bharat, 1969). Par le passé, plusieurs chercheurs ont énuméré la microflore du phylloplane (Takahashi et coll., 1995, Watanabe et coll., 1998 et Neelu Nangia et coll., 1999). Sukumar et Ramalingam (1986) en travaillant sur la microflore du phylloplane de variétés de mûrier indiennes ont observé qu'on trouve une flore bactérienne maximum sur la surface supérieure de la feuille. On trouve une flore bactérienne naturelle dans l'intestin des lignées de ver à soie (Iwanami et Ono, 1963 ; Takizawa et Lizuka, 1968 ; Iizuka et Takizawa, 1969 ; Steinhaus, 1963). Dans cette étude, on a énuméré la microflore du phylloplane de variétés de mûrier indiennes populaires, c'est-à-dire V1, Kanva2, MR 2 et DD (Viswa). On a étudié leur influence sur la microflore de l'intestin et sur la croissance et sur le développement des lignées de ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

Recueil des échantillons :

On a procédé à cette étude pour vérifier la microflore de la phyllosphère de quatre variétés de mûrier indiennes, c'est-à-dire V1, Kanva2, MR2 et DD. On échantillonne les feuilles de mûrier du

* Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore.

sommet, du milieu et du bas de 10 plants sélectionnés au hasard et on les recueille séparément dans des sacs en polyéthylène stériles. On coupe cinq disques (2 cm) sur chaque feuille en utilisant un emporte pièce et on les place immédiatement dans de l'eau stérile (100 ml) et on mélange pendant 30 minutes.

Isolement de la microflore du phylloplane :

On sélectionne des feuilles de mûrier succulentes sans maladie des variétés mentionnées ci-dessus et on les conserve séparément. On étudie la microflore du phylloplane de manière à trouver la source des microbes dans l'intestin du ver à soie. On utilise la technique d'étalement sur plaque (Robert, 1967) pour décrire la population microbienne. On procède à l'énumération de la flore bactérienne en utilisant un milieu nutritif d'agar (extrait de bœuf 3 g, Peptone 5g, chlorure de sodium 8g, agar 15g).

Maintien des lignées de ver à soie :

On alimente les lignées de ver à soie Pure Mysore et CSR2, obtenues à partir de pontes saines, avec les feuilles de mûrier saines des variétés V1, Kanva2, MR2, DD. On élève les lignées de ver à soie dans une pièce d'élevage dans des conditions hygiéniques avec une température (25-28° C) et une humidité relative (60-70° C) optimales. On procède à l'alimentation avec les feuilles 3 à 4 fois par jour, après l'éclosion. On élève les larves de vers à soie, en fonction des variétés respectives, pour l'extraction de l'intestin, l'énumération de la microflore et pour l'enregistrement des paramètres de croissance et de développement, c'est-à-dire le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse.

Isolement de la microflore de l'intestin :

Pour l'isolement de la microflore de l'intestin, on sélectionne des larves du 5^{ème} âge de 2 jours et on les affame pendant 4 à 6 h à une température (26-28° C) et une humidité relative (60 à 70 %) optimales avant la dissection. On stérilise la surface des larves avec de l'alcool et on procède à la dissection dans des conditions stériles. Après l'isolement, on homogénéise immédiatement les intestins dans un tampon de potassium à 0,1 M (pH 7,0). Puis, on transfère les homogénats des intestins dans des flacons et on les conserve à 5° C pendant la nuit, avant de les laver trois fois avec un tampon phosphate sans glutaraldéhyde (Breznak et Pankratz, 1977). On utilise la technique d'étalement sur plaques (Robert, 1967) pour énumérer la population bactérienne de l'intestin en utilisant un milieu nutritif d'agar.

Analyse statistique :

On analyse les données en utilisant le test d'analyse de variance (ANOVA). On procède à l'analyse de corrélation pour s'assurer de la relation entre la charge en bactéries de l'intestin et les paramètres économiques du ver à soie.

RESULTATS

Enumération de la microflore du phylloplane :

La microflore du phylloplane énumérée chez les variétés de mûrier est présentée dans le Tableau I. On peut observer une différence significative de charge en microflore du phylloplane parmi les variétés de mûrier évaluées. La charge en bactéries du phylloplane des variétés de mûrier est comprise dans la fourchette de $1,78 \text{ à } 2,01 \times 10^7$ cfu /g. Parmi les variétés de mûrier, MR2 enregistre la charge bactérienne significativement la plus élevée de $2,01 \times 10^7$ cfu / g, suivie par V1 ($1,83 \times 10^7$ cfu / g) et Kanva 2 ($1,82 \times 10^7$ cfu / g) qui sont cependant à égalité.

La flore bactérienne courante du phylloplane énumérée inclut *Enterobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp et *Staphylococcus* sp. La flore bactérienne courante de l'intestin énumérée comprend *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *E. cloacae* et *Micrococcus* sp.

Relation entre les variétés de mûrier et les bactéries de l'intestin :

On observe des différences dans la population bactérienne de l'intestin des lignées de ver à soie (Tableau II). Parmi les variétés de mûrier évaluées, MR2 donne une charge en bactéries significativement plus élevée de respectivement $2,82 \times 10^7$ cfu / g et de $2,65 \times 10^7$ cfu / g chez les races CSR2 et PM. Après MR2, les variétés Kanva2, DD et V1 donnent une charge en flore bactérienne de l'ordre de $2,42 \times 10^7$ cfu / g à $2,68 \times 10^7$ cfu / g. Parmi les lignées évaluées, CSR2 enregistre une charge en bactéries de l'intestin comparativement plus élevée que PM.

Relation entre les bactéries de l'intestin et les paramètres économiques du ver à soie :

On enregistre les observations sur les paramètres économiques du ver à soie, comme le poids de la larve, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse chez les lignées de ver à soie élevées séparément sur quatre variétés de mûrier, c'est-à-dire Kanva 2, MR2, DD et V1. On a évalué l'influence de la charge en microflore de l'intestin sur les paramètres économiques du ver à soie grâce à des études de corrélation. Les résultats de l'étude de corrélation sont présentés dans le Tableau III. Les valeurs de r^2 (coefficient de détermination) reflètent le degré de variabilité exercé par la microflore de l'intestin sur les différents paramètres économiques.

La comparaison des valeurs r^2 montre que les paramètres économiques, c'est-à-dire le poids de la larve, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse de CSR2 sont positivement influencés par la population bactérienne de l'intestin, avec les valeurs de r^2 qui sont comprises entre 60,65 et 91,24 % pour ces paramètres économiques. Tandis que chez Pure Mysore, la charge en bactéries de l'intestin influence positivement le poids de la larve, le poids du cocon et le poids de la coque, elle n'influence pas la richesse soyeuse. La comparaison du coefficient de détermination entre les deux races pures montre l'influence plus importante de la charge de la microflore de l'intestin sur les paramètres économiques du ver à soie chez CSR2 que chez Pure Mysore.

DISCUSSION

Microflore du phylloplane :

La microflore du phylloplane énumérée chez quatre variétés de mûrier, c'est-à-dire MR2, Kanva2, V1 et DD (Tableau I) révèle que la variété MR2 enregistre la charge en bactéries du phylloplane la plus élevée de $2,01 \times 10^7$ cfu / g, suivie par V1 ($1,83 \times 10^7$ cfu / g) et par Kanva 2 ($1,82 \times 10^7$ cfu / g). Neelu Nangia et coll. (1999), ont déjà enregistré des différences de charge en microflore de l'intestin chez des races de ver à soie élevées sur différentes variétés de mûrier. La microflore de la phyllosphère reste une source principale de microflore de l'intestin pour une majorité d'insectes herbivores. Les microbiotes de la sauterelle, *Schistocerca gregaria* sont dominés par la microflore de la phyllosphère de leurs habitats d'herbe (Dillon et Dillon, 2004). La variété de mûrier MR2 pourrait probablement avoir fourni une meilleure niche pour la colonisation par la microflore de la phyllosphère que les autres variétés.

Relation entre les variétés de mûrier et la microflore de l'intestin :

La comparaison de la population bactérienne de l'intestin entre des races pures PM et CSR2 et leurs plantes hôtes est présentée dans le Tableau II. D'après le Tableau, il est possible de remarquer que la charge en bactéries de l'intestin est significativement plus élevée chez les races de ver à soie PM et CSR2 quand on les élève sur les feuilles de MR2, plutôt que sur d'autres variétés. On pourrait attribuer les différences relatives de charge en bactéries de l'intestin chez les lignées de ver à soie à leurs plantes hôtes, puisque la plante hôte sert de source principale pour la microflore des insectes. Bien que les variétés V1 et MR2 aient des valeurs nutritives relativement plus élevées que les autres variétés à l'étude, il faudrait étudier les facteurs exacts responsables de la charge plus élevée en bactéries de l'intestin chez les vers à soie élevés sur MR2. Il est probable qu'il y a une flore bactérienne commune qui habite à la fois la phyllosphère de MR2 et l'intestin du ver à soie.

Relation entre les variétés de mûrier et la croissance et le développement :

Cette étude tente d'explorer l'influence positive de la microflore du phylloplane sur la microflore bénéfique de l'intestin du ver à soie et son impact sur les paramètres économiques du ver à soie (Tableau III). La corrélation positive entre la charge en microflore de l'intestin et les paramètres économiques du ver à soie comme le poids de la larve, le poids du cocon et le poids de la coque, que reflètent les valeurs plus élevées du coefficient de détermination, met en évidence l'influence positive de la microflore de l'intestin sur la croissance et le développement du ver à soie.

Il y a eu beaucoup d'études antérieures sur la contribution nutritionnelle de la microflore de l'intestin. Bosticco et Arnaudo (1955) ont émis des hypothèses sur le rôle des actinomycètes de l'intestin comme source pour la synthèse de la vitamine B12 chez les vers à soie. Kalpana et coll., (1999) ont étudié le rôle des isolats bactériens de l'intestin sur la nutrition du ver à soie. On a observé qu'une grande majorité de ces isolats est productrice de protéases et de casseurs de lipides et de polysaccharides. Les bactéries qui habitent l'intestin du ver à soie élaborent de l'amylase, de la caséinase, de la gélatinase, de la lipase et de l'uréase. Compte tenu de la demande plus élevée en protéines pendant les derniers stades du ver à soie, le rôle des bactéries de l'intestin est plus accentué pendant l'assimilation des protéines de la feuille de mûrier. On peut donc en déduire que MR2, une variété avec une teneur élevée en protéines (20 à 22 %) pourrait être favorable au développement de la charge en microflore de l'intestin, qui à son tour influence positivement le potentiel d'alimentation et la digestibilité chez les larves de ver à soie et entraîne de meilleurs paramètres de croissance et de développement.

Le phylloplane sert de source pour l'inoculum de bactéries de l'intestin. Takahashi et coll., (1995) ont rapporté qu'on détecte couramment les bactéries épiphytiques *Erwinia herbicola* dans les feuilles de mûrier et la pyrale du mûrier, *Glyphodes pyloalis*. Watanabe et coll., (1998) ont observé qu'on détecte fréquemment deux genres de bactéries *E. herbicola* et *Staphylococcus* sp. dans l'intestin ou les excréments des vers à soie qui se nourrissent sur des feuilles de mûrier. La survie et les tests de croissance de l'inoculum épiphytique dans l'intestin des larves de ver à soie montre qu'*E. herbicola* se multiplie dans l'intestin du ver à soie six jours après l'inoculation.

On a fréquemment détecté *Enterobacter cloacae* dans la phyllosphère des plantes (Ladha et coll., 1983). Watanabe et Sato, 1998 ont décrit des souches d'*E. cloacae* qui habitent les plantes et les insectes. Watanabe et coll., (1998) ont observé que les bactéries *Staphylococcus*, que l'on trouve couramment dans l'intestin d'insectes variés ne survivent pas sur les feuilles de mûrier. Mais, Neelu Nangia et coll., (1999) ont constaté la présence de *Micrococcus* sp. et de *Staphylococcus* sp. sur le phylloplane d'une variété de mûrier indienne, M5. La colonisation de la microflore du phylloplane dans l'intestin des lignées du ver à soie suggère l'existence de souches d'espèces bactériennes qui habitent les plantes et les insectes. On peut vraisemblablement émettre l'hypothèse que la variété de mûrier MR2 est plus propice à la croissance de ces souches bactériennes. L'association positive entre les bactéries du phylloplane et les bactéries de l'intestin du ver à soie se reflète par l'amélioration des paramètres économiques du ver à soie.

Relation entre la microflore du phylloplane et la mortalité du ver à soie :

Dans cette étude, on enregistre environ 5 à 8 % de mortalité due à la flacherie bactérienne chez les lignées de ver à soie. L'examen préliminaire des cadavres de larves indique une contamination brute de l'intestin par plusieurs espèces bactériennes. Cependant, aucune étude détaillée n'a été entreprise sur la cause de la flacherie bactérienne ainsi que sur la pathogénicité de différents isolats bactériens, car les études sont centrées sur l'influence positive de la microflore du phylloplane sur la croissance et sur le développement du ver à soie.

CONCLUSION

La microflore de la phyllosphère est conditionnée par le microenvironnement et par la niche favorable disponible sur la surface des feuilles. La valeur nutritionnelle plus élevée de la variété de mûrier MR2, associée à la présence d'une niche adaptée, pourrait contribuer à la meilleure colonisation par la microflore de la phyllosphère. La plus grande quantité de microbiotes de l'intestin énumérés chez les lignées de ver à soie élevées sur ces variétés implique l'existence de souches bactériennes communes aux plantes et aux insectes, qui habitent sur la surface de la feuille de mûrier. De plus, il est possible de déduire de l'étude que l'association positive entre la microflore de la phyllosphère et les microbiotes de l'intestin influence la croissance et le développement généraux du ver à soie. Comme les feuilles servent aussi de source de contamination, il est prudent d'isoler les souches de la microflore bénéfique qui habitent l'intestin à partir du phylloplane des feuilles de mûrier, car elles pourraient trouver des applications plus importantes dans l'industrie séricicole pour les préparations de consortiums microbiens, tels qu'un produit nutraceutique pour augmenter les paramètres économiques du ver à soie.

IMPACT OF TASAR GUARD ON TASAR SILKWORM (*ANTHERAEA MYLITTA* D.) REARING PERFORMANCE AND INCIDENCE OF DISEASES UNDER TROPICAL CONDITIONS

P. VENKATARAMANA¹, B. NARASIMHA MURTHY², J. V. KRISHNA RAO³,
P. JAYAPRAKASH⁴ & S. B. DANDIN⁵

- 1, 2. Research Extension Centre, Central Silk Board, Vikarabad—501 101 (A. P.), India.
3. Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Anantapur—515 001 (A. P.), India.
4. Regional Tasar Research Station, Central Silk Board, Warangal—506 009 (A. P.), India.
5. Silkworm Seed Organization, Central Silk Board, Bangalore—560 068, India.

*In the present study a tasar silkworm (*Antheraea mylitta* Drury) an Andhra local race was utilized to know the effect of Tasar Guard (an aqueous extract of *P. coryleifolia*) on the rearing performance and loss due to diseases in three seasons i.e. rainy, autumn and winter under tropical climatic conditions after oral administration through the leaves of *Terminalia arjuna*. It was recorded that the larval and cocoon characters were significantly improved with 800-1000 ppm of Tasar Guard compared to the other treatments and control in all three seasons. Incidence of virosis and bacteriosis diseases were also significantly suppressed with the doses of 800-1000 ppm of Tasar Guard in all three seasons. The findings suggest that the doses of 800-1000 ppm of Tasar Guard significantly enhanced the larval and cocoon characters and suppressed the incidence of virosis and bacteriosis diseases in all seasons.*

Keywords: *Antheraea mylitta* Drury, Tasar Guard, larval duration, cocoon characters, virosis, bacteriosis.

INTRODUCTION

The tropical Andhra local eco-race of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury is a polyphagous insect (Jolly *et al.*, 1968). Considerable cocoon loss in tasar culture (Thangavelu *et al.*, 1990) occurs due to incidence of grasserie (viral) flacherie (bacterial) and pebrine (protozoan) diseases caused by polyhedral virus, *Bacillus* spp. and *Nosema* spp., respectively. Among these, the viral and bacterial diseases are major factors in reducing the cocoon yield. Different antibiotics and growth stimulating factors are extensively used to enrich the nutrients of farm and other animals for increasing their productivity. In the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., few studies were carried out by different workers by feeding the enriched mulberry leaves with small quantities of different antibiotics (Sharada and Bhat, 1956; Radha *et al.*, 1981; Baig *et al.*, 1990) inorganic compounds (Majumdar, 1982) and plant based antiviral aqueous extract of *Psoralea coryleifolia* (Karpuragum) (Venkataramana *et al.*, 2003), who found a significant improvement in the egg fecundity, larval characters, cocoon characters, silk content and reduction in grasserie and bacterial diseases during three different seasons, i. e., rainy, summer and winter.

Further, several methods were employed to prevent the diseases by using bed disinfectants such as Resham Keet Oushad (RKO) (Samson *et al.*, 1987) and Vijetha Datta *et al.*, 1998) Resham Jyothi (Sashidharan *et al.*, 2000) and feeding leaves with antibiotics (Baig *et al.*, 1990) and aqueous extract of *P. coryleifolia* (Venkataramana *et al.*, 2003). The perusal of literature reveals that such investigations have not been conducted in tasar silkworm, *A. mylitta*. Aiming at importance of these studies, the present investigation was designed to know the effect of "Tasar guard" (aqueous extract

of *P. coryleifolia*) on tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. rearing performance and incidence of diseases in three seasons, i. e., rainy, autumn and winter under tropical climatic conditions.

MATERIALS AND METHODS

The larvae of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., were used as test insect in the present investigation. In each treatment, worms were selected randomly in three replications with 300 worms each. The experiment was conducted in three seasons, rainy, autumn, and winter. Precaution was taken that the leaves were consumed before the spray. Four different concentrations of Tasar Guard (0.1% aqueous extract of plant, *Psoralea coryleifolia* L.) (Kapuragram) prepared by S. V. Chemicals, Kolar (India) i.e., 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm and 1000 ppm were prepared in distilled water. Leaves of *P. coryleifolia* (8 g) were macerated separately with a small quantity of distilled water in glass pestle and mortar and then passed through a double layer muslin cloth and final volume made up to one litre. This was diluted further ten times using distilled water containing 0.1% teepol to get a suspension of 800 ppm. The botanical spray was conducted with the help of knapsack sprayer once during III and V instar worms on the bushes of *Terminalia arjuna*. The control group fed on untreated bushes was maintained for comparison with the treated group. The diseased larvae were identified during every morning at 10 a. m. and recorded in both the treatment and control and the data were subjected to the following formula to derive percentage incidence of diseases as:

$$\% \text{ incidence of disease} = \frac{\text{No. of diseased larvae}}{\text{Total no. of test larvae}} \times 100$$

The experiment was conducted at Mudimyala Forest Farm near Chevella, Ranga Reddy district (A. P.) maintained by the Department of Forest, Govt. of Andhra Pradesh during 2006-07. The data pertaining to larval duration, ERR %, larval weight, single cocoon weight and shell weight, shell ratio and percent incidence of diseases were recorded and analysed statistically by using two way analysis of variance tests (Snedecor and Cochran, 1967) to derive the statistical significance.

RESULTS

The data pertaining to the effect of different concentrations of Tasar Guard on the economic characters of the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. in three different seasons are presented in Tables I-III.

Larval duration and larval weight:

The perusal of the data presented in Table I, indicate that in all three seasons the duration of larval period up to the initiation of spinning was reduced with all the concentrations of Tasar Guard. The maximum reduction in larval period was recorded with 1000 ppm in all three seasons (i. e. in autumn, - 6.442%, rainy: - 5.210%, winter: - 3.75) when compared to that of the other treatments and controls. The maximum larval weight was recorded with 1000 ppm in all three seasons (i.e., autumn: 4.5%; rainy: 9.85%; winter: - 3.75) when compared to that of other treatments and controls. The maximum larval weight was recorded with 1000 ppm in all three seasons (i.e. autumn: 4.5 %; rainy: 9.85%; winter: 7.50%) followed by 800 ppm (i.e., in autumn: 5%; rainy: 8.97%; winter: 5.69%) 600 ppm and 400 ppm. However, the values obtained for this character with the concentrations of 800 ppm, 600 ppm and 400 ppm were just on par with their respective controls.

Cocoon weight, shell weight, and shell ratio:

The perusal of results presented in Table II revealed that Tasar Guard used in this study elicited a positive influence in silk production. Though many of the treatments appeared to have exerted

substantiate influence on tasar silkworm, the maximum improvement in cocoon weight was recorded in 1000 ppm treatment during all the seasons (i. e., in autumn: 23.8%; rainy: 7.6%; winter: 7.75%) more than with other treatments and controls.

Table I. Effect of feeding Tasar Guard on larval characters and ERR of Tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., in three different seasons (average of 5 replications).

*Tableau I. Effet de l'administration de Tasar Guard sur les caractères de la larve et l'ERR du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D., pendant trois saisons différentes (moyenne de 5 répétitions).*

Dosage of Tasar guard (ppm)	Season	Larval duration Days: hrs	% Difference	Weight of 10 larvae (g)	% difference	ERR %	% difference
<i>Dosage du Tasar guard (ppm)</i>	<i>Saison</i>	<i>Durée larvaire Jours : heures</i>	<i>% de différence</i>	<i>Poids de 10 larves (g)</i>	<i>% de différence</i>		<i>% de différence</i>
400	Rainy / Saison des pluies	36.19	- 0.476	22.88	6.42	65.19	46.50
	Autumn / Automne	38.21	- 0.753	24.21	3.02	57.38	18.50
	Winter / Hiver	39.23	- 1.925	20.91	2.00	59.92	18.66
600	Rainy / Saison des pluies	37.19	- 2.132	23.41	8.88	67.71	51.80
	Autumn / Automne	37.20	- 3.376	24.56	4.50	57.41	19.60
	Winter / Hiver	39.21	- 1.975	21.73	6.00	58.38	15.60
800	Rainy / Saison des pluies	37.18	- 2.157	23.43	8.97	68.98	55.00
	Autumn / Automne	37.15	- 3.506	24.68	5.00	59.30	19.50
	Winter / Hiver	39.12	- 2.200	21.67	5.69	59.52	17.85
1000	Rainy / Saison des pluies	36.02	- 5.210	23.62	9.85	68.87	54.76
	Autumn / Automne	36.02	- 6.442	24.56	4.50	70.99	47.90
	Winter / Hiver	38.50	- 3.750	21.93	7.50	75.10	48.71
Control Témoin	Rainy / Saison des pluies	37.00	—	21.50	—	44.50	—
	Autumn / Automne	38.00	—	23.50	—	48.00	—
	Winter / Hiver	40.00	—	20.50	—	50.50	—
Dosage S. E. / Ecart type dose		0.199	—	0.192	—	0.880	—
C. D. at 5%		0.500	—	0.480	—	1.684	—
Season S.E. / Ecart type saison		0.124	—	0.115	—	1.608	—
C. D at 5%		0.300	—	0.290	—	1.650	—

% difference: transformed values / % de différence : valeurs transformées ; **ERR %**: Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage.

Similar to cocoon weight, shell weight was also improved substantially by tasar Guard, the maximum improvement in shell weight was observed with 1000 ppm during all the seasons (i.e. in autumn: 38.8%; rainy: 28%; winter: 35%) followed by 800 ppm, 600 ppm and 400 ppm concentrations. Similar to cocoon and shell weights, the maximum improvement in shell ratio was recorded in 1000 ppm treatment in all the seasons (i. e., in autumn: 38.6%; rainy: 27.8%; winter: 35.5%) followed by 800 ppm (i. e., in autumn: 29.6%; rainy: 25.6%; winter: 32.5%)

Table II. Effect of feeding Tasar Guard on cocoon characters of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., in 3 different seasons (average of 5 replications).

Tableau II. Effet de l'administration de Tasar Guard sur les caractères du cocon du ver à soie tasar, Antheraea mylitta D. pendant 3 saisons différentes (moyenne de 5 répétitions).

Dosage of Tasar Guard (ppm)	Season	Single cocoon (g)	% difference	Single shell weight (g)	% difference	Single shell ratio (%)	% difference
<i>Dosage du Tasar guard (ppm)</i>	<i>Saison</i>	<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>% de différence</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>% de différence</i>	<i>Richesse soyeuse individuelle (%)</i>	<i>% de différence</i>
400	Rainy / Saison des pluies	7.73	6.50	0.894	5.20	13.87	5.1
	Autumn / Automne	8.66	15.80	1.154	16.50	17.41	16.80
	Winter / Hiver	7.87	5.00	1.089	14.60	15.80	14.50
600	Rainy / Saison des pluies	7.66	5.60	1.007	18.50	15.66	18.65
	Autumn / Automne	7.41	13.50	1.263	27.50	19.15	28.50
	Winter / Hiver	7.98	6.50	1.147	20.80	16.64	20.60
800	Rainy / Saison des pluies	7.47	3.00	1.097	26.00	16.58	25.60
	Autumn / Automne	9.03	21.95	1.305	31.85	19.31	29.60
	Winter / Hiver	6.05	7.08	1.249	31.50	18.29	32.50
1000	Rainy / Saison des pluies	7.80	7.60	1.088	28.00	16.87	27.80
	Autumn / Automne	7.97	23.80	1.374	38.80	20.65	38.60
	Winter / Hiver	8.07	7.75	1.283	35.00	18.70	35.50
Control Témoin	Rainy / Saison des pluies	7.25	—	0.850	—	13.20	—
	Autumn / Automne	7.40	—	0.990	—	14.90	—
	Winter / Hiver	7.49	—	0.950	—	13.80	—
Dosage S. E./ Ecart type dose		0.018	—	0.009	—	0.025	—
C. D. at 5%		0.050	—	0.018	—	0.019	—
Season S. E. Ecart type saison		0.0110	—	0.005	—	1.899	—
C. D. at 5%		0.034	—	0.0195	—	0.560	—

% difference: transformed values / % de différence : valeurs transformées.

Table III. Effect of Tasar Guard on diseases of Tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., in 3 different seasons (average of 5 replications).

Tableau III. Effet du Tasar Guard sur les maladies du ver à soie Tasar, Antheraea mylitta D. pendant 3 saisons différentes (moyenne de 5 répétitions).

Dosage of Tasar Guard (ppm)	Season	Virosis (%)	% difference	Bacteriosis (%)	% difference	Total (%)	% difference
<i>Dosage du Tasar Guard (ppm)</i>	<i>Saison</i>	<i>Viroses (%)</i>	<i>% de différence</i>	<i>Bactérioses</i>	<i>% de différence</i>		<i>% de différence</i>
400	Rainy / Saison des pluies	14.81	-40.76	20.00	-34.43	34.81	-37.29
	Autumn / Automne	14.50	-27.50	28.12	-12.12	42.62	-18.04
	Winter / Hiver	15.60	-17.90	24.48	-19.74	40.08	-19.25
600	Rainy / Saison des pluies	10.50	-58.00	21.79	-28.56	32.29	-41.18
	Autumn / Automne	15.80	-21.00	26.79	-16.28	42.59	-18.09
	Winter / Hiver	16.50	-13.15	25.12	-15.16	41.62	-15.91
800	Rainy / Saison des pluies	10.50	-5.80	20.52	-32.72	31.02	-44.11
	Autumn / Automne	15.20	-24.00	25.50	-21.88	40.70	-21.73
	Winter / Hiver	15.25	-19.73	25.23	-17.28	40.48	-19.09
1000	Rainy / Saison des pluies	9.50	-6.04	21.63	-29.08	31.13	-67.56
	Autumn / Automne	8.50	-5.75	20.51	-35.72	29.01	-82.67
	Winter / Hiver	7.50	-60.52	17.40	-42.95	24.90	-94.96
Control Témoin	Rainy / Saison	25.00	—	30.50	—	55.50	—
	Autumn / Automne	20.00	—	32.00	—	52.00	—
	Winter / Hiver	19.00	—	30.50	—	49.50	—
Dosage S. E. / Ecart type dose		0.918	—	0.650	—	0.98	—
C. D. at 5%		2.160	—	1.750	—	1.786	—
Season S. E. / Ecart type saison		0.500	—	0.430	—	1.700	—
C. D. at 5%		1.600	—	1.230	—	1.760	—

% difference: transformed values / % de différence : valeurs transformées.

ERR % and incidence of diseases:

Among the concentrations of tasar guard, the maximum effective rate of rearing (ERR%) was observed with 1000 ppm in all the seasons (i. e., in autumn: 70.99%; rainy: 68.87%; winter: 75.10%) followed by 800 ppm, 600 ppm and 400 ppm (Table I). Similar to the increase in ERR%, the reduction in viral and bacterial diseases was maximum with 1000 ppm (Table III) in all the three season. The

loss in the incidence of both the diseases was recorded with all the concentrations of tasar guard in all the seasons. The reduction in viral disease was maximum at all the concentrations of Tasar Guard more than the reduction in flacherie disease during all the seasons studied.

DISCUSSION

Evaluation of the effect of any chemical or physical agent and plant foliage constituents depend upon the rate of development and viability (Sankaranarayana, 1969; Gayathri and Krishnamurthy, 1979; Keating *et al.*, 1990). The parameters analyzed in the present investigation herald the effect of the growth regulators and viability in tasar silkworm, *A. mylitta* D.

In this investigation, the authors observed a reduction in larval duration and an increase in larval weight, shell weight and shell ratio with feeding on bushes sprayed with the different concentrations, i.e. 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm and 1000 ppm of Tasar Guard, in different seasons. It is emphasized that the Tasar Guard accelerates the growth and development of tasar worms through orientation of physiological activity and thereby reduces the larval duration and increases the silk content in the cocoons. (Sivaprakasam and Rabindra, 1996). Reduction in larval period will be advantageous as this will minimize the larval mortality and increases the silk. No investigation was conducted on the efficacy of botanical extracts on larval and cocoon characters of Tasar silkworm, *A. mylitta* D. Literature on this line was absolutely nil. The effect of Tasar Guard in enhancing the cocoon characters in different seasons are in confirmation with the findings of Rajashekar Gowda (1991), who reported that the extract of *P. coryleifolia* and *T. terrestris*, enhanced the economic characters of *B. mori* L. The growth promoting effect of the botanicals was also reported by Murugan *et al.*, (1998), who observed that the treatment of *B. mori* L. with botanicals, i.e., *P. coryleifolia* and *T. terrestris* increased the silk gland; cocoon weight and silk ratio. Sivaprakasam and Rabindra (1996) reported that aqueous leaf extract of *P. coryleifolia* enhanced the silk gland, cocoon weight and shell ratio. Sivaprakasam and Rabindra (1996) and Venkataramana *et al.*, (2003) also reported that aqueous leaf extracts of *P. coryleifolia* increase the cocoon characters.

The overall investigation revealed that feeding Tasar silkworms, *A. mylitta* D. on the bushes of *Terminalia arjuna* sprayed with *P. coryleifolia* (Tasar Guard) during three different seasons, i.e., autumn, rainy and winter, under tropical climatic conditions is effective in reducing the larval period, increasing the larval weight, survival rate and cocoon characters and also preventing the occurrence of both viral and bacterial diseases.

REFERENCES

- BAIG M., NATARAJU B., SAMSON M. V. (1990) Studies on the effect of antibiotics on rearing performance and loss due to diseases in silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 29(1), 54-58.
- DATTA R. K., BAIG M., NATARAJU B., ALAVENKATASUBBAH M., SELVAKUMAR T. (1998) Vijetha: an effective bed disinfectant. Indian Silk, 1: 12-13.
- GAYATHRI M. V., KRISHNAMURTHY N. B. (1979) Differential sensitivity of different species of *Drosophila* to Ceresan, a mercurial fungicide. Ind. J. Exp. Biol., 17(4), 433-435.
- JOLLY M. S., CHATURVEDI S. N., PRASAD S. (1968) A survey of tasar crops in India. Indian J. Seric., 7, 156-167.
- KEATING S. T., HUNTER M. D., SCHULT J. C. (1990) Leaf phenolic inhibition of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus and role of polyhedral inclusion body aggregations. J. Chem. Ecol., 16, 1445-1457.
- MAJUMDAR A. C. (1982) Notes on the physiological effects on the growth and production of silkworms fed on mulberry leaves soaked in potassium iodide. Indian J. Agric. Sci., 52(4), 250-252.

- MURUGAN K., JEYABALAN D., SENTHIL KUMAR N., SENTHIL NATHAN S., SIVAPRAKASAM S. (1998) Growth promoting effect of plant products in silkworm. A biotechnology. J. Sci. & Ind. Res. 57(11), 740-745.
- RADHA N. V., NATARAJAN T., MUTHUKRISHNAN T. S., OBLISAM S. (1981) Effect of antibiotics on growth and productivity of mulberry silkworm. Proc. Seric. Symp. & Semin. 1980 TNAU, Coimbatore, India, 173-177pp.
- RAJASEKAR GOWDA R. (1991) Studies on the method to increase silk yield of *Bombyx mori* L. Ph. D. thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 22 p.
- SAMSON M. V., BAIG M., JOLLY M. S. (1987) "Resham Keet Oushadh" – a prospective bed disinfectant against grasserie and muscardine. Indian Silk, 25(11), 16-18.
- SANKARANARAYANA K. (1969) The effect of nitrogen and oxygen frequency of X-ray induced dominant lethals and the physiology of the sperms in *Drosophila melanogaster*. Mut. Res., 4, 641-661.
- SHARADA K., & BHAT J. V. (1956) Effect of chloromycetin and glycine on the growth and production of silk by *Bombyx mori* L. J. Indian Inst. Sci., 1, 21-26.
- SASHIDHARARN T. O., SINGH R. N. & SAMSON M. V. (2000) Efficacy of a new bed disinfectant "Resham Jyothi" under field conditions. Indian J. Seric., 39(1), 41-42.
- SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R. J. (1996) Integrated disease management methods for grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 35(2), 122-127.
- SNEDECOR W. G., COCHRAN G. W. (1967) In: Statistical methods. Ed. Oxford and IBH publications, India. 245-251 pp.
- THANGAVELU K., BANSAL A. K., SHUKLA R. M., SAXENA N. N., JAYASWAL J., GOEL A. K. (1990) Evaluation of some chemicals for prevention of diseases in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae). Indian J. Seric., 34(2), 142-144.
- VENKATARAMANA P., SURYANARAYANA N., DATTA R. K. (2003) The effect of "Seri Guard" on rearing performance and loss due to diseases in silkworm, *Bombyx mori* L., Sericologia, 43(2), 191-197.

IMPACT DU TASAR GUARD SUR LA PERFORMANCE D'ELEVAGE DU VER A SOIE TASAR (*ANTHRAEA MYLITTA* D.) ET SUR L'INCIDENCE DES MALADIES DANS DES CONDITIONS TROPICALES

P. VENKATARAMANA¹, B. NARASIMHA MURTHY², J. V. KRISHNA RAO³,
P. JAYAPRAKASH⁴ & S. B. DANDIN⁵

- 1, 2. Research Extension Centre, Central Silk Board, Vikarabad – 501 101 (A. P.), Inde.
3. Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Anantapur – 515 001 (A. P.), Inde.
4. Regional Tasar Research Station, Central Silk Board, Warangal – 506 009 (A. P.), Inde.
5. Silkworm Seed Organization, Central Silk Board, Bangalore – 560 068, Inde.

Dans cette étude sur le ver à soie tasar (*Antheraea mylitta*) on a utilisé une race locale Andhra pour connaître l'effet du Tasar Guard (un extrait aqueux de *P. coryleifolia*) sur la performance d'élevage et sur les pertes dues aux maladies pendant trois saisons, c'est-à-dire la saison des pluies, l'automne et l'hiver dans des conditions climatiques tropicales, après son administration orale par les feuilles de *Terminalia arjuna*. On observe que les caractères du cocon et de la larve s'améliorent significativement avec 800 à 1000 ppm de Tasar Guard, par comparaison aux autres traitements et au témoin pendant les trois saisons. L'incidence des maladies virales et bactériennes diminue de manière significative avec les doses de 800 à 1000 ppm de Tasar Guard pendant les trois saisons. Les résultats suggèrent que les doses de 800–1000 ppm de Tasar Guard améliorent significativement les caractères de la larve et du cocon et suppriment l'incidence des maladies virales et bactériennes, pendant toutes les saisons.

INTRODUCTION

L'écorace tropicale Andhra local du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* Drury est un insecte polyphage (Jolly et coll., 1968). Il se produit une perte considérable de cocons dans l'élevage du tasar (Thangavelu et coll., 1990) en raison de l'incidence de la grasserie (maladie virale), de la flacherie (maladie bactérienne) et de la pébrine (maladie due au protozoaire), provoquées respectivement par les virus polyédriques *Bacillus* spp. et *Nosema* spp. Parmi elles, les maladies virales et bactériennes sont les principaux facteurs de diminution du rendement en cocons. On a beaucoup eu recours à différents antibiotiques et stimulateurs de la croissance pour enrichir les nutriments des animaux de ferme et d'autres animaux afin d'augmenter leur productivité. Chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L., plusieurs chercheurs ont entrepris des études en enrichissant les feuilles de mûrier avec de petites quantités de différents antibiotiques (Sharada et Bhat, 1956 ; Radha et coll., 1981 ; Baig et coll., 1990), de composés inorganiques (Majumdar, 1982)) et avec un extrait aqueux antiviral à base de plante de *Psoralea coryleifolia* (Karparagam) (Venkataramana et coll., 2003) et ils ont observé une amélioration significative de la fécondité (des œufs), des caractères de la larve, des caractères du cocon, de la teneur en soie et la diminution de la grasserie et des maladies bactériennes pendant trois saisons différentes, c'est-à-dire la saison des pluies, l'été et l'hiver.

Par ailleurs, plusieurs méthodes ont été employées pour prévenir les maladies en utilisant des désinfectants de litière, tels que le Resham Keet Oushad (RKO) (Samson et coll., 1987 et Vijetha Datta et coll., 1998), le Resham Jyothi (Sashidharan et coll., 2000) et en enrichissant les feuilles avec des antibiotiques (Baig et coll., 1990) et avec un extrait aqueux de *P. coryleifolia* (Venkataramana et

coll., 2003). L'étude de la littérature révèle que ce type d'études n'a pas été réalisées chez le ver à soie tassar, *A. mylitta*. Compte tenu de l'importance de ces études, cette recherche a été conçue pour connaître l'effet du « Tassar Guard » (extrait aqueux de *P. coryleifolia*) sur la performance d'élevage du ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* D. et sur l'incidence des maladies pendant trois saisons, c'est-à-dire la saison des pluies, l'automne et l'hiver, dans les conditions climatiques tropicales.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette étude, nous avons utilisé les larves du ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* D. comme insecte test. Dans chaque traitement, on sélectionne les vers au hasard dans trois répétitions de 300 vers chacune. On réalise l'expérience pendant trois saisons, la saison des pluies, l'automne et l'hiver. On prend des précautions pour que les feuilles soient consommées avant la vaporisation. Quatre concentrations différentes de Tassar Guard (extrait aqueux de la plante *Psoralea coryleifolia* L. à 0,1 %), (Karpuragram) sont préparées par S. V. Chemicals, Kolar (Inde), c'est-à-dire 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm et 1000 ppm dans de l'eau distillée. On fait macérer les feuilles de *P. coryleifolia* (8g) séparément avec une petite quantité d'eau distillée en utilisant un pilon et un mortier en verre, on les passe au travers d'un tissu de mousseline à deux épaisseurs et on réalise un volume final d'un litre. On le dilue à nouveau dix fois en utilisant de l'eau distillée contenant du teepol à 0,1 % pour obtenir une suspension à 800 ppm. On réalise la vaporisation botanique à l'aide d'un vaporisateur portable sur les buissons de *Terminalia arjuna* une fois pour les vers du 3^{ème} et du 5^{ème} âge. On maintient un groupe témoin, nourri sur des buissons non traités, pour comparaison avec le groupe traité. On identifie les larves malades chaque matin à 10 heures et on les enregistre à la fois chez le traitement et chez le témoin et on soumet les données à la formule suivante, pour déduire le pourcentage d'incidence des maladies :

$$\% \text{ d'incidence des maladies} = \frac{\text{Nb de larves malades}}{\text{Nb total de larves testées}} \times 100$$

On réalise l'expérience dans une Ferme Forestière de Mudimyala près de Chevella, dans la région de Ranga Reddy (A. P.) maintenue par le Département des Forêts, Gouvernement de l'Andhra Pradesh en 2006-07. On enregistre les durées larvaires, le % ERR, le poids de la larve, le poids d'un cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et le pourcentage d'incidence des maladies et on les analyse statistiquement en utilisant les tests d'analyse de variance à deux facteurs (Snedecor et Cochran, 1967) pour obtenir la signification statistique.

RESULTATS

Les données appartenant à l'effet des différentes concentrations de Tassar Guard sur les caractères économiques du ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* D. pendant trois saisons sont présentées dans les Tableaux I à III.

Durée larvaire et poids de la larve :

L'étude des données présentées dans le Tableau I montre que pendant les trois saisons, la durée de la période larvaire jusqu'au début du filage diminue avec toutes les concentrations de Tassar Guard. On enregistre la diminution maximum de la durée larvaire avec 1000 ppm pendant les trois saisons (c'est-à-dire en automne, - 6,442 % ; pendant la saison des pluies : -5,210 %, en hiver : - 3,75 %) par comparaison aux autres traitements et témoins. On enregistre le poids larvaire maximum avec 1000 ppm pendant les trois saisons (c'est-à-dire automne : 4,5 % ; saison des pluies : 9,85 % ; hiver : 7,50 %), suivi par 800 ppm (c'est-à-dire automne, 5 % ; saison des pluies, 8,97 % ; hiver : 5,69 %),

par 600 ppm et par 400 ppm. Cependant, les valeurs obtenues pour ce caractère avec les concentrations de 800 ppm, 600 ppm et 400 ppm sont à égalité avec les témoins respectifs.

Poids du cocon, poids de la coque et richesse soyeuse :

Les résultats présentés dans le Tableau II montrent que le Tasar Guard utilisé dans cette étude exerce une influence positive sur la production de soie. Bien que beaucoup de traitements semblent avoir exercé une influence considérable sur le ver à soie tasar, on enregistre l'amélioration maximum pour le poids du cocon avec le traitement de 1000 ppm pendant toutes les saisons (c'est-à-dire, en automne : 23,8 % ; pendant la saison des pluies : 7,6 % ; pendant l'hiver : 7,75 %) plus qu'avec les autres traitements. Comme pour le poids du cocon, le tasar Guard améliore considérablement le poids de la coque, on observe l'amélioration maximum du poids de la coque avec 1000 ppm pendant toutes les saisons (c'est-à-dire en automne : 38,8 % ; pendant la saison des pluies : 28 % ; en hiver : 35 %), suivi par les concentrations de 800 ppm, 600 ppm et 400 ppm. Comme pour les poids du cocon et de la coque, on enregistre l'amélioration maximum pour la richesse soyeuse avec le traitement de 1000 ppm pendant toutes les saisons (c'est-à-dire, en automne : 38,6 % ; pendant la saison des pluies : 27,8 % ; en hiver : 35,5 %) suivi par 800 ppm (c'est-à-dire en automne : 29,6 % ; pendant la saison des pluies : 25,6 % ; en hiver : 32,5 %).

% ERR et incidence des maladies :

Parmi les concentrations de tasar guard, on observe le taux effectif d'élevage maximum (% ERR) avec 1000 ppm pendant toutes les saisons (c'est-à-dire automne : 70,99 % ; saison des pluies : 68,87 % et hiver : 75,10 %), suivi par 800 ppm, 600 ppm et 400 ppm (Tableau I). Comme pour l'augmentation du % ERR, la diminution des maladies virales et bactériennes est maximum avec 1000 ppm (Tableau III) pendant les trois saisons. On enregistre une diminution de l'incidence des maladies avec toutes les concentrations de tasar guard pendant toutes les saisons. La diminution de la maladie virale est maximum avec toutes les concentrations de tasar Guard, plus que la diminution de la maladie de la flacherie pendant toutes les saisons étudiées.

DISCUSSION

L'évaluation de l'effet de n'importe quel produit chimique ou agent physique et des constituants du feuillage des plantes dépend du taux de développement et de la viabilité (Sankaranarayana, 1969 ; Gayathri et Krishnamurthy, 1979 ; Keating et coll., 1990). Les paramètres analysés dans cette étude soulignent l'effet des régulateurs de croissance et la viabilité chez le ver à soie tasar, *A. mylitta* D.

Dans cette étude, les auteurs ont observé une diminution de la durée larvaire et une augmentation du poids larvaire, du poids de la coque et de la richesse soyeuse grâce à l'alimentation avec des buissons vaporisés avec les différentes concentrations, c'est-à-dire 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm et 1000 ppm de Tasar Guard pendant les différentes saisons. On souligne que le Tasar Guard accélère la croissance et le développement des vers tasar par l'orientation de leur activité physiologique et diminue donc la durée larvaire et augmente la teneur en soie des cocons (Sivaprakasam et Rabindra, 1996). La diminution de la durée larvaire est avantageuse, car cela minimise la mortalité larvaire et augmente la quantité de soie. Aucune étude n'a été réalisée sur l'efficacité des extraits botaniques sur les caractères de la larve et du cocon chez le ver à soie tasar, *A. mylitta* D. La littérature sur ce sujet est absolument inexistante. L'effet du Tasar Guard pour améliorer les caractères du cocon pendant différentes saisons confirme les observations de Rajashekar Gowda (1991), qui a rapporté que l'extrait de *P. coryleifolia* et de *T. terrestris*, améliore les caractères économiques de *B. mori*. Murugan et coll., (1998) ont aussi rapporté l'effet de promotion de la croissance des substances botaniques et ont observé que le traitement de *B. mori* avec des substances botaniques augmente le poids de la glande séricigène et du cocon et la richesse soyeuse. Sivaprakasam et Rabindra (1996) ont rapporté que l'extrait aqueux de la feuille de *P. coryleifolia* améliore le poids de la glande séricigène, du cocon et

la richesse soyeuse. Sivaprakasam et Rabindra (1996) et Venkataramana et coll., (2003) ont aussi rapporté que les extraits aqueux de la feuille de *P. coryleifolia* améliorent les caractères du cocon.

L'étude générale révèle que l'alimentation des vers à soie tasar, *A. mylitta* D. sur les buissons de *Terminalia arjuna* vaporisés avec *P. coryleifolia* (Tasar Guard) pendant trois saisons différentes, l'automne, la saison des pluies et l'hiver, dans des conditions climatiques tropicales, est efficace pour diminuer la durée larvaire, augmenter le poids larvaire, le taux de survie et les caractères du cocon et aussi empêcher les maladies à la fois virales et bactériennes.

DEVELOPMENT AND TRANSFER OF MICROBIAL TECHNOLOGY FOR PROTECTION OF TASAR COCOON CROP AT FIELD LEVEL

D. K. ROY*, ALOK SAHAY, G. P. SINGH, N. G. OJHA & N. B. VIJAYAPRAKASH

Silkworm Pathology, Central Tasar Research and Training Institute, Piskanagri, Ranchi-835303, Jharkhand, India

Leaf surface microflora (LSM) of tropical tasar food plant Terminalia arjuna D. was explored for antagonistic property. The most potent antagonistic bacterium isolated from leaf surface microflora was found capable of inhibiting the growth and proliferation of some other bacteria including some pathogens of tasar silkworm. The antimicrobial action of the leaf surface bacteria was also obtained against the multiplication of viral pathogen namely Antheraea mylitta Cytoplasmic polyhedrosis virus. By manipulating the concentration of the antagonistic bacteria on the leaf surface it has been possible to enhance the anti-microbial action against the development of pathogens in tasar silkworm larvae. The phenomenon of natural antagonism has been transformed into a technology for protection of silkworm from bacterial and viral infection in field condition. Field application of the technology has been conducted in regional research stations, research extension centers of tropical tasar and in farmers' field of different tasar growing states of India namely Andhra Pradesh, Orissa, Chattisgarh, Jharkhand, West Bengal, Maharashtra and Uttar Pradesh. A reduction of bacteriosis from 7.64 to 1.68% and virosis from 28.18 to 12.88% has been registered at farmers' level. The technology has been very consistent in view of improvement of the cocoon productivity in outdoor condition. An average increase of 15 cocoons per dfl has been achieved which can fetch a net gain of Rs. 1356 to a farmer from one crop of 100 dfls. The performance observed in different tropical tasar cultivating areas of the country has made the technology viable for improvement of tasar crop at a larger scale.

Keywords : Leaf surface microflora, Antagonistic bacteria,

INTRODUCTION

Tasar silkworm is susceptible to a variety of insect pathogens that cause a heavy loss (30–35%) to tasar cocoon crop (Sen *et al*, 1969). Control of insect diseases is having its limitation through chemotherapeutic measures. Plant surface microbes with antagonistic property have been utilized to control a wide variety of pathogens infecting agricultural crops (Baker *et al.*, 1985. Blakeman and Brodie, 1976; Rishbeth, 1988). Phylloplane microflora, the commonly known leaf surface microflora (LSM) of *Terminalia arjuna* a food plant of tasar silkworm *Antheraea mylitta* D was explored by us and observed that they carry certain bacteria capable of inhibiting other microbial organisms (Roy *et al*, 2000). The detail study of antimicrobial spectrum revealed that these bacteria antagonize different groups of microbes including those, which cause diseases of tasar silkworm. To exploit the antagonistic property of leaf surface microflora for the protection of tasar silkworm diseases a study of the isolated bacteria was carried out (Roy *et al*, 2002). The paper deals with the impact of the antagonistic bacteria in controlling the development of bacterial pathogens and implementation of a

* dkroycsbranchi@rediffmail.com

technology in different tropical tasar growing states of India for protection of tasar crop from bacterial and viral diseases and subsequent improvement of cocoon yield in field level.

MATERIALS AND METHODS

The leaf surface bacteria were isolated and purified from tasar food plant *Terminalia arjuna*. Antibacterial activity of the selected leaf surface bacteria was evaluated against certain bacterial pathogens of silkworm namely *Bacillus sphaericus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* sp. *Proteus vulgaris* and *Citrobacter* sp and also against *Staphylococcus aureus*. Antibacterial activity of the selected leaf surface bacteria was evaluated through cross streak assay method. The antibacterial activity was scored from the length (mm) of the growth inhibition of the test organisms on agar plates. For determination of antiviral property indoor rearing was performed. Freshly grown bacteria of *T. arjuna* was harvested and the bacterial suspension (10^4 /ml) was first sprayed on the foliage and fed to II instar larvae. In the second set, 5 days after feeding with bacterial suspension, the larvae were fed with polyhedral virus (10^5 /ml). A third set, kept as control, was provided with the suspension of polyhedral virus (10^5 /ml) only. Larval mortality due to virosis was recorded daily up to 10th day. For large-scale application of the technology the selected antagonistic bacterium was first grown in the laboratory in 25 ml Luria broth medium (containing Tryptone 10g, Yeast extract 5g, Sodium chloride 5g per litre of distilled water pH 7.0) taken in 100 ml Erlenmeyer flask in shake culture and used as inoculum for mass multiplication in a Lab Fermentor New Brunswick Scientific USA. The bacterial cells were harvested after 48 hours of growth, washed and a leaf surface microbial formulation (LSM) was prepared with desired concentration of bacterial cells before distribution in ampoules. LSM ampoules were stored in 10-12°C till its application during rearing. For field trial of the technology LSM ampoules were supplied to its research extension units, and farmers through State Department of Sericulture. For application of the microbial formulation in field one day before each spray 4-5 KG of soil was taken in a container and mixed thoroughly with 10-liter (approx) water and kept for overnight to allow settling of soil particles. On the next day the clear soil water was taken out of the container without stirring the soil settled at the bottom. For field application the technology the content of one microbial ampoule has been mixed with 5 litre of freshly prepared soil water to make the desired microbial suspension of LSM. Foliar spray of the LSM has been done on the rearing bushes once each in II and III instar of larval growth. For field trial of the technology 10 replication of 50 dfls for both treatment and control were used in the Research Extension Centres and Regional Tasar Research Station. For large scale technology trial at farmers level, 50 - 100 farmers of different areas of all tasar cultivating Indian states adopted technology trial, each farmer was provided with LSM ampoules for 100 dfls rearing and was considered as one replication and all the farmers of an area were divided into 1:1 ratio for treatment and control lots respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

The most potent antagonistic bacteria, isolated from the Leaf Surface Microflora of tasar food plant *Terminalia arjuna* was identified as *Bacillus laterosporus*, Laubach (Roy *et al*, 2006). The *Bacillus laterosporus*, associated with tasar food plant is one of the naturally occurring species classified as non-pathogenic to human being. It creates a balance of microflora in the gut (Anthony Cichoke, 1997). Here the *Bacillus laterosporus* was capable of inhibiting the growth of a variety of bacterial species and pathogens of silkworm namely *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* sp, *Bacillus sphaericus* and *Citrobacter* sp. and also showed inhibition against multiplication of polyhedral viruses (Fig- 1 & Table I). Iizuka, (1983) and Nagaraju *et al* (1992-93) observed the antibacterial activity in the midgut bacterial flora in *Bombyx mori* L. and tasar silkworm respectively. Kobayashi (1991) reported the inhibitory effect of some bacteria on Nuclear polyhedrosis virus in *B. mori*.

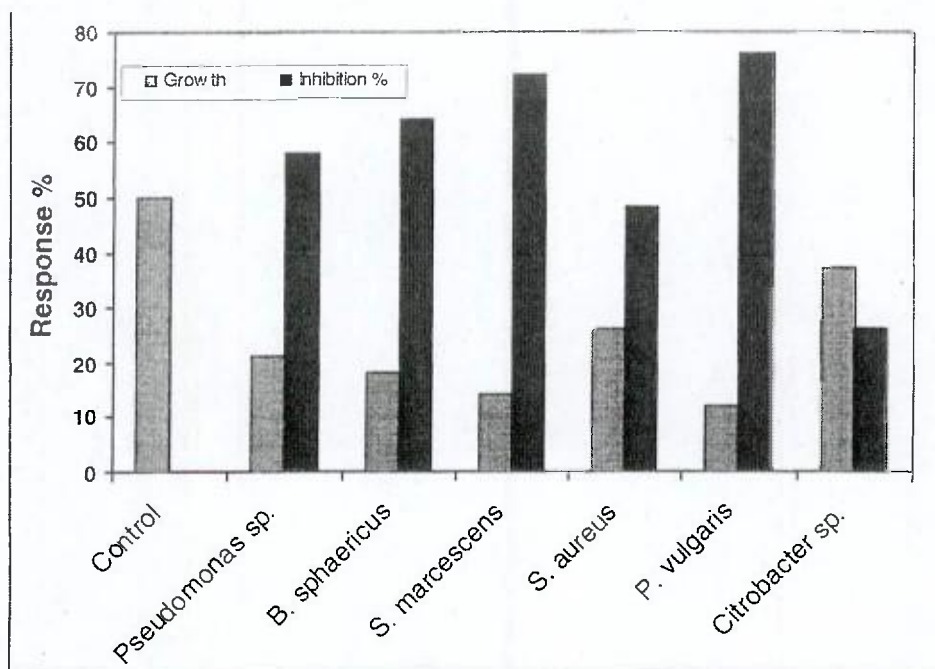


Fig. 1. Antibacterial activity of LSM against test organism.

Fig. 1. Activité antibactérienne des LSM contre les organismes testés.

Spray schedule for foliar application of LSM:

For field application of the leaf surface microbial formulation its antagonistic potential was strengthened through standardization of various cultural factors, optimizing the population level and retention of the living cells on the leaves during mass rearing in field. Water suspension of the bacteria were sprayed on the food plants at different period of larval growth at experimental plots and it was observed that larval population which was fed with antagonistic bacteria from II instar onwards performed better in both the crops. Reduction of the disease was in the range of 47.33% (Table II) that led to improve the growth as evidenced by increase in larval weight by 9.05%. Minimizing of larval loss due to diseases was also reflected through improvement of ERR by 52.71 % over control. On the contrary when the treatment started from late stage of growth (from III instar) it could not contain diseases for securing higher survivability of larvae. The crop performance was on the higher side when the treatment was given from the early larval instars only. It is evident from the result that 2nd and 3rd instar of larval growth are crucial in establishing the resistance towards the diseases. This emphasizes the fact that bio-control strategies should be targeted against uninfected host or small pathogen population to prevent the build-up of diseases rather than to control the existing high level of pathogens.

Table I. Effect of antagonistic leaf bacteria on multiplication of cytoplasmic polyhedral virus of tasar silkworm.*Tableau I. Effet de bactéries antagonistes de la feuille sur la multiplication du virus de la polyédrose cytoplasmique du ver à soie tasar.*

Mode of treatment	Concentration (cells per ml)	Larval instars for Treatment	Larval mortality due to virosis (%)
<i>Mode de traitement</i>	<i>Concentration (cellules par ml)</i>	<i>Âges larvaires traités</i>	<i>Mortalité larvaire due aux viroses (%)</i>
Feeding with bacteria / <i>Charge en bactéries</i>	10 ⁴	II	13.50
Feeding with bacteria / <i>Charge en bactéries</i> and CPV / <i>et en CPV</i>	10 ⁴ 10 ⁵	II III	38.30
Feeding with CPV / <i>Charge en CPV</i>	10 ⁵	II	100.00
CD at 5%			6.12

Table II. Effect of spray schedule of LSM for foliar application.*Tableau II. Effet du calendrier de vaporisation pour l'application foliaire de LSM.*

LSM Spray in instars	Larval mortality (%) due to disease			Larval weight (in grams)	Increase in larval weight	ERR %	Reduction in disease mortality	Increase in ERR %
	Virosis	Bact.	Total					
	<i>Mortalité larvaire provoquée par les maladies (%)</i>							
<i>Vaporisation LSM au cours des âges</i>	<i>Viroses</i>	<i>Bact.</i>	<i>Total</i>	<i>Poids de la larve (g)</i>	<i>Augmentation du poids larvaire</i>		<i>Diminution de la mortalité provoquée par les maladies</i>	<i>Augmentation de l'ERR (%)</i>
II	20.30	23.80	44.10	35.70	0.22	41.00	12.10	4.17
II & III	15.00	14.60	29.60	37.00	2.52	56.16	26.60	19.33
II-IV	12.30	18.20	30.50	37.60	3.12	54.00	25.76	17.20
II-V	13.60	16.00	29.60	36.35	2.37	53.00	26.60	16.20
III-V	22.10	30.00	52.70	34.80	0.30	37.00	3.50	0.17
Control / <i>Témoin</i>	24.40	31.80	56.20	34.50		36.80		
CD at 5%	5.64	3.29	4.43	1.764		8.80		

Preparation of the product and Transfer of technology:

To promote cell growth and retention of the population of the beneficial microbes, which is sprayed on the surface of leaf during rearing, a simple technique was developed. Soil-water, having naturally occurring soil ingredients, as carrier has been selected which supports microbial growth in natural condition. This carrier was selected on the basis of effectiveness, ready availability and not having any cost involvement. The selected carrier was not found to interfere with the growth of the desired bacteria on the surface of leaf.

Table III. Impact of application of LSM technology at CTR & TI research extension centres (RECS).

Tableau III. Impact de l'application de la technologie LSM dans les centres de vulgarisation de la recherche du CTR & TI (RECS).

Year		Virosis (%)	Bacts. (%)	Total mortality for disease	Yield (cocoon/df)	Virosis Reduction (%)	Bacteriosis Reduction (%)	Improvement in Yield (Cocoon/df)
Année		Viroses (%)		Mortalité totale provoquée par les maladies	Rendement (cocons / ponte saine)	Diminution des viroses (%)	Diminution des bactérioses (%)	Amélioration du rendement (cocons / ponte saine)
2003	T	14.40	4.80	19.20	51.50	15.50	4.30	10.44
	C	30.00	9.10	39.10	41.07			
2004	T	12.70	3.70	16.40	76.45	9.80	5.40	15.99
	C	22.50	9.10	31.60	60.46			
2005	T	17.00	3.80	20.80	48.10	17.50	3.90	16.00
	C	34.50	7.70	42.20	32.10			
2006	T	8.30	4.35	12.65	53.30	12.30	5.85	21.80
	C	20.60	10.20	30.80	31.50			
Averag Moyenne	T	13.10	4.16	17.26	57.34	13.80	4.86	16.06
	C	26.90	9.02	35.92	41.28			
CD at 5%		8.832	3.217		9.364			

T – Treatment / Traitement, C – Control / Témoin.

The evolved technology has been tested for four years in Research Extension Centres (REC) and Regional Tasar Research Station (RTRS) which are working in all the tasar growing areas. It is evident from the results of RECs (Table III) and RTRSs (Table IV) that the technology was effective in all the places of tasar cultivation covering different states. Field trial was also conducted for four years at a larger scale at farmer's level of different tasar growing states of India namely Andhra Pradesh, Orissa, Chattisgarh, Jharkhand, West Bengal, Maharashtra, and Uttar Pradesh. It is evident from the results (Table V) that the manipulation of the population of the beneficial bacteria on the leaf surface to a desired level provides a healthy feeding and congenial environment for growth of silkworm in nature. A significant reduction in the larval mortality due to virosis (50.75%) and bacteriosis (63.25%) led to higher survivability of worms that eventually contributed to higher tasar cocoon production. The technology was very useful at farmers' level in view of consistent improvement in their existing level of cocoon productivity by 17-20 cocoons/ dfl. The impact of the technology was more pertinent in the farmers' field in view of the fact that the incidences of bacteriosis and virosis of higher level have been effectively contained by the application of the antagonistic bacteria. The impact of the technology has been consistent throughout years in all the sectors of tasar cultivation (Table VI).

Table IV. Impact of application of LSM technology at CTR & TI Regional Tasar Research Stations (RTRS).

Tableau IV. Impact de l'application de la technologie LSM dans les Stations Régionales de Recherche du Tasar du CTR & TI (RTRS).

Year		Virosis (%)	Bacts. (%)	Total mortality for disease	Yield (cocoon/dfl)	Virosis reduction (%)	Bacteriosis reduction (%)	Improvement in Yield (Cocoon/dfl)
Année		Viroses (%)		Mortalité totale provoquée par les maladies	Rendement (cocons / ponte saine)	Diminution des viroses (%)	Diminution des bactérioses (%)	Amélioration du rendement (cocons / ponte saine)
2003	T	12.00	4.00	16.00	52.04	15.70	5.10	11.04
	C	27.70	9.10	36.80	41.00			
2004	T	13.9	2.10	15.75	52.00	8.60	4.80	8.90
	C	22.5	6.90	29.85	43.10			
2005	T	16.40	5.80	22.20	47.60	11.00	5.88	7.10
	C	27.40	11.68	38.90	40.50			
2006	T	10.4	3.30	13.70	55.70	9.70	6.90	19.22
	C	20.10	9.40	29.50	36.48			
Average Moyenne	T	13.17	3.80	16.91	50.83	11.25	5.60	11.56
	C	24.42	9.40	33.76	40.27			
CD at 5%		7.524	3.428	11.549	8.623			

T – Treatment / *Traitement*, C – Control / *Témoin*.

Table V. Impact of application of LSM technology at farmers level of different tasar growing states.

Tableau V. Impact de l'application de la technologie LSM au niveau des fermiers de différents états cultivant le tasar.

Year		Virosis (%)	Bacts. (%)	Total mortality for disease	Yield (cocoon/ dfl)	Virosis reduction (%)	Bacteriosis reduction (%)	Improvement in Yield (Cocoon/dfl)
Année		Viroses (%)		Mortalité totale provoquée par les maladies	Rendement (cocons / ponte saine)	Diminution des viroses (%)	Diminution des bactérioses (%)	Amélioration du rendement (cocons / ponte saine)
2003	T	10.35	1.17	11.52	36.90	18.15	12.63	19.30
	C	28.50	13.80	42.30	17.60			
2004	T	13.80	1.75	15.60	41.50	10.70	2.98	20.70
	C	24.50						
2005	T	15.20	1.80	17.00	32.30	16.80	7.45	16.90
	C	32.00	9.25	41.25	15.40			
2006	T	12.18	2.02	14.20	37.30	15.54	1.16	18.30
	C	27.72	3.18	30.90	19.00			
Average	T	12.88	1.68	14.52	37.00	15.30	6.04	18.80
Moyenne	C	18.18	7.64	35.86	18.20			
CD at 5%		11.284	2.323	14.842	12.764			

T – Treatment / *Traitement*, C – Control / *Témoin*.

Table VI. Overall impact of application of LSM technology in field.

Tableau VI. Impact global de l'application de la technologie LSM sur le terrain.

Year		Virosis	Bacts.	Total mortality for disease	Yield (cocoon / dfl)	% reduction in virosis	% reduction in bacteriosis	% reduction on total disease	% Yield improvement
Année		Viroses (%)		Mortalité totale provoquée par les maladies	Rendement en cocons / ponte saine	% de diminution des viroses	% de diminution des bactérioses	% de diminution de la totalité des maladies	% d'amélioration du rendement
RTRS	T	13.17	3.80	16.91	50.83	46.07	59.45	49.91	28.71
	C	24.42	9.42	33.76	40.27				
REC	T	13.10	4.16	17.26	57.34	51.30	58.33	52.18	38.90
	C	26.90	9.02	35.92	41.28				
Farmer / <i>Fermiers</i>	T	12.88	1.68	14.52	37.00	54.29	79.05	59.50	103.0
	C	28.18	7.64	35.86	18.20				
Overall / <i>Général</i>	T	13.05	3.20	16.25	48.71	50.75	63.25	46.16	31.74
	C	26.50	8.70	35.20	33.25				

T – Treatment / *Traitement*, C – Control / *Témoin*.

Table VII. Cost benefit ratio of the LSM technology for 100 dfls rearing.*Tableau VII. Ratio coût bénéfice de la technologie LSM pour un élevage de 100 pontes saines.*

Sl. No.	Particulars	
No. de série	Caractéristiques	
1	Cost of the microbial ampoule for 100 dfl rearing <i>Coût d'une ampoule microbienne pour un élevage de 100 pontes saines</i>	Rs. 40.00
2	Expenditure towards LSM spray @ Rs 75/ spray (× 2) <i>Dépenses concernant la vaporisation de LSM à raison de 75 Rs / vaporisation (× 2)</i>	Rs.150.00
3	Cocoon production with the adoption of technology <i>Production de cocons avec l'adoption de la technologie</i>	4871
4	Cocoon production without technology adoption <i>Production de cocons sans l'adoption de la technologie</i>	3325
6	Gain of cocoon after adoption of technology <i>Gain de cocons après l'adoption de la technologie</i>	1546
7	Additional income from the sell of 1546 cocoons (@Rs1.00/cocoon) <i>Revenu supplémentaire de la vente de 1546 cocons (à raison de 1 Re / cocon)</i>	Rs. 1546.00
8	Net profit with the adoption of technology <i>Profit net avec l'adoption de la technologie</i>	Rs. 1356.00

An average gain of 15 cocoons per dfl at field level has been estimated that can fetch a net profit of Rs. 1356 to a tasar grower from 100 dfls (Table VII).

REFERENCES

- ANTHONY CICHOK, D.C. (1997) Probiotic balance – Digestion and improve overall health. Nutrition Science News. 2(8): 382 – 382
- BLAKEMAN, J. P. & BRODIE, I. D. S. (1976) Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surface. In Microbiology of Aerial plant Surfaces (Eds. C.H. Dickinson and T. F Preece.) Academic Press, London. pp. 529-557.
- IIZUKA, T. (1983) Studies on the bacterial flora in the midgut and on the antibacterial activity in the digestive juice of larvae of silkworm *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 23: 227-244.
- KOBAYASHI, H. (1991) Effect of some bacteria on the infection of Nuclear polyhedrosis virus in silkworm (*B. mori*). Gumma J. Agri. Res. Ser. B. Seri. JPN. 8: 19-22.
- NAGARAJU, J., ABRAHAM, E. G., SETHURAMAN, B. N. & DATTA, R. K. (1992-93) Purification of an induced antibacterial protein from the haemolymph of wild silkworm *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). *Wild Silkmths* 3: 23-30.

- RISHBETH, J. (1988) Biological control of air born pathogens. In biological control of pests, pathogens and weeds. (Eds. R. K. S. Wood and M. J. Way. The Royal Society, London), pp.155-171.
- ROY, D. K., BANSAL A.K., SAXENA N.N. & SINHA B. R. R. P.(2000) Biological control of tasar silkworm diseases with leaf surface antagonistic bacteria. International Journal of Wild Silkworm, 5: 43-46.
- ROY D. K., SAHAY D.N., RAI S., SINHA B.R.R.P. & THANGAVELU K. (2002) Leaf microflora – A biological tool to control silkworm diseases. Proceedings of National Conference on Strategies for Sericulture Research and Development. November, 16-18, 2000 (Ed) S. B. Dandin and V. P. Gupta, CSR&TI., Mysore, pp 378-382
- ROY D. K., SINGH G. P., SAHAY ALOK, SAHAY D. N. & N. SURYANARAYANA (2006) Leaf surface microflora for tasar crop improvement. Indian Silk. 45(8): 19-21
- SEN, S.K., JOLLY, M.S. & JAMMY, T. R. (1969) Diseases of tasar silkworm *Antherea mylitta* Drury (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE) . Ind. J. Seri., 8: 11-14.

MISE AU POINT ET TRANSFERT D'UNE TECHNOLOGIE MICROBIENNE POUR LA PROTECTION DE LA RECOLTE DE COCONS TASAR SUR LE TERRAIN

D. K. ROY*, ALOK SAHAY, G. P. SINGH, N. G. OJHA & N. B. VIJAYAPRAKASH

Silkworm Pathology, Central Tasar Research and Training Institute, Piskanagri, Ranchi – 835 303, Jharkhand, Inde.

On a exploré la microflore de la surface de la feuille (LSM) de la plante hôte du tasar tropical Terminalia arjuna D. par rapport à ses propriétés antagonistes. La bactérie antagoniste la plus puissante isolée à partir de la microflore de la surface de la feuille s'avère capable d'inhiber la croissance et la prolifération d'autres bactéries y compris de certains pathogènes du ver à soie tasar. On a aussi obtenu une action des bactéries de la surface de la feuille contre la multiplication du pathogène viral, à savoir le virus de la polyédrose cytoplasmique d'Antheraea mylitta. En manipulant la concentration des bactéries antagonistes sur la surface de la feuille, il a été possible d'améliorer l'action anti-microbienne contre le développement des pathogènes chez les larves du ver à soie du tasar. Le phénomène d'antagonisme naturel a été transformé en une technologie pour la protection du ver à soie contre l'infestation bactérienne et virale sur le terrain. On a réalisé l'application de la technologie sur le terrain dans les stations de recherche régionales, les centres de vulgarisation de la recherche du tasar tropical et sur les terrains des fermiers dans différents états élevant le tasar, à savoir l'Andhra Pradesh, l'Orissa, le Chattisgarh, le Jharkand, le Bengale ouest, le Maharashtra et l'Uttar Pradesh. On enregistre une diminution de la bactériose de 7,64 à 1,68 % et de la virose de 28,18 à 12,88 % au niveau des fermiers. La technologie contribue à améliorer la productivité des cocons dans les conditions de terrain. On a obtenu une augmentation moyenne de 15 cocons par ponte saine, qui peut donner un gain net de 1356 Rs à un fermier, à partir d'une récolte de 100 pontes saines. La performance observée dans différentes zones d'élevage du tasar du pays rend la technologie viable pour l'amélioration de la récolte tasar à une plus grande échelle.

INTRODUCTION

Le ver à soie tasar est sensible à un ensemble d'insectes pathogènes qui provoquent des pertes importantes (30 à 35 %) en matière de récolte de cocons tasar (Sen et coll., 1967). La lutte contre les maladies des insectes se limite aux mesures chimiques. On a utilisé les microbes de la surface des plantes avec des propriétés antagonistes pour lutter contre un grand nombre de pathogènes qui infestent les cultures agricoles (Baker et coll., 1985 ; Blakeman et Brodie, 1976 ; Rishbeth, 1988). On a exploré la microflore du phylloplane, la microflore ordinairement connue de la surface de la feuille (LSM) de *Terminalia arjuna*, une plante hôte du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. et on a observé qu'elle contient certaines bactéries capables d'inhiber certains organismes microbiens (Roy et coll., 2000). L'étude détaillée du spectre antimicrobien révèle que ces bactéries sont antagonistes envers différents groupes de microbes, y compris envers ceux qui provoquent les maladies du ver à soie tasar. On a entrepris une étude des bactéries isolées pour exploiter les propriétés antagonistes de la microflore de la surface de la feuille pour la protection contre les maladies du ver à soie tasar (Roy et coll., 2002). L'article traite de l'impact des bactéries antagonistes dans la lutte contre le développement des pathogènes bactériens et de la mise en place de la technologie dans différents états

* dkroycsbranchi@rediffmail.com

d'élevage du tasar en Inde pour la protection de l'élevage tasar des maladies bactériennes et virales et l'amélioration consécutive du rendement en cocons sur le terrain.

MATERIELS ET METHODES

On isole et on purifie les bactéries de la surface de la feuille sur la plante hôte du tasar, *Terminalia arjuna*. On évalue l'activité antibactérienne des bactéries sélectionnées sur la surface de la feuille à savoir *Bacillus sphaericus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas sp.* *Proteus vulgaris* et *Citrobacter sp.* et aussi contre *Staphylococcus aureus*. On a évalué l'activité antibactérienne des bactéries sélectionnées sur la surface de la feuille par la méthode de dosage en stries. On calcule l'activité antibactérienne d'après la longueur (mm) de l'inhibition de la croissance des organismes testés sur des plaques agar. Pour la détermination des propriétés antivirales, on procède à un élevage à l'intérieur. On recueille des bactéries de *T. arjuna* venant de pousser et on vaporise la suspension bactérienne (10^4 / ml) sur le feuillage et on en nourrit les larves du 2^{ème} âge. Pour le deuxième lot, 5 jours après leur avoir administré la suspension bactérienne, on administre seulement le virus polyédrique (10^5 / ml). On administre seulement une suspension du virus de la polyédrose (10^5 / ml) au troisième lot, conservé comme témoin. On enregistre quotidiennement la mortalité larvaire provoquée par les maladies virales jusqu'au 10^{ème} jour. Pour l'application de la technologie à grande échelle, on cultive d'abord la bactérie antagoniste sélectionnée en laboratoire dans 25 ml de milieu de bouillon Luria (contenant du Tryptone 10 g, 5g d'extrait de levure, 5g de chlorure de sodium par litre d'eau distillée au pH de 7,0) placé dans un flacon Erlenmeyer dans une culture secouée et on l'utilise comme inoculum pour la multiplication en masse dans un Lab Fermentor New Brunswick Scientific USA. On recueille les cellules bactériennes au bout de 48 heures de croissance, on les lave et on prépare une formulation de microbes de la surface de la feuille (LSM) avec la concentration désirée de cellules bactériennes avant la distribution dans des ampoules. On stocke les ampoules LSM à 10-12° C jusqu'à leur application pendant l'élevage. Pour l'essai de la technologie sur le terrain, on fournit des ampoules LSM aux unités de vulgarisation de la recherche et aux fermiers par l'intermédiaire du Département d'Etat de la Sériciculture. Pour l'application de la formulation microbienne sur le terrain, un jour avant chaque vaporisation, on prend 4 à 5 kg de sol dans un récipient et on les mélange soigneusement avec dix litres (approximativement) d'eau et on les conserve pendant la nuit pour que les particules de sol forment un dépôt. Le jour suivant, on sort l'eau claire du récipient sans mélanger le sol qui a formé un dépôt au fond. Pour l'application de la technologie sur le terrain, on mélange le contenu d'une ampoule microbienne avec 5 litres d'eau du sol fraîchement préparée pour réaliser la suspension microbienne désirée de LSM. On procède à la vaporisation foliaire de LSM sur les buissons d'élevage une fois pendant le 1^{er} et le 3^{ème} âge de la croissance larvaire. Pour l'essai de la technologie sur le terrain, on utilise 10 répétitions de 50 pontes saines à la fois pour le traitement et pour le témoin dans les Centres de Vulgarisation de la Recherche et dans la Station Régionale de Recherche du Tassar. Pour l'essai de la technologie à grande échelle au niveau des fermiers, 50 à 100 fermiers d'états indiens élevant le tasar ont essayé la technologie et on fournit à chaque fermier des ampoules LSM pour l'élevage de 100 pontes saines, que l'on considère comme une répétition et on divise tous les fermiers d'une zone dans un ratio de 1 : 1 respectivement entre les lots traités et témoins.

RESULTATS ET DISCUSSION

La bactérie antagoniste la plus puissante, isolée de la microflore de la surface de la feuille de la plante hôte du tasar que l'on a identifié est *Bacillus laterosporus*, Laubach (Roye et coll., 2006). Le *Bacillus laterosporus*, qui est associé avec la plante hôte du tasar est l'une des espèces classées comme non pathogènes pour l'être humain. Elle crée une microflore équilibrée dans l'intestin (Anthony Cichoke, 1997). Là, *Bacillus laterosporus* est capable d'inhiber la croissance d'un ensemble d'espèces

bactériennes et de pathogènes du ver à soie à savoir *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus sphaericus* et *Citrobacter* sp. et présente aussi une inhibition contre la multiplication de virus polyédriques (Fig. 1. & Tableau I). Iizuka (1983) et Nagaraju et coll., (1992-93) ont observé une activité antibactérienne dans la flore bactérienne de l'intestin moyen respectivement chez *Bombyx mori* L. et chez le ver à soie tasar. Kobayashi (1991) a signalé l'effet inhibiteur de certaines bactéries sur le virus de la polyédrose nucléaire chez *B. mori*.

Calendrier de vaporisation pour l'application foliaire de LSM :

Pour l'application sur le terrain de la formulation microbienne de la surface de la feuille, on a renforcé son potentiel antagoniste par la standardisation de plusieurs facteurs culturels, pour optimiser le niveau de population et la rétention des cellules vivantes sur les feuilles pendant l'élevage en masse sur le terrain. On vaporise la suspension hydrique des bactéries sur les plantes hôtes pendant différentes périodes de croissance larvaire dans les parcelles expérimentales et on observe que la population larvaire, à laquelle on administre des bactéries antagonistes à partir du 2^{ème} âge, donne de meilleurs résultats dans les deux récoltes. La diminution de la maladie est de l'ordre de 47,33 % (Tableau II), ce qui conduit à améliorer la croissance, comme le montre l'augmentation du poids de la larve de 9,05 %. L'amélioration de l'ERR de 52,71 % par rapport au témoin illustre aussi la diminution de la perte de larves. A l'inverse, quand le traitement commence pendant le dernier stade de croissance (à partir du 3^{ème} âge), il ne peut pas contenir les maladies pour assurer une capacité de survie plus élevée des larves. La performance de récolte est plutôt élevée, quand on procède au traitement au début. Il est évident d'après les résultats que les 2^{ème} et 3^{ème} âges larvaires sont cruciaux pour établir la résistance envers les maladies. Cela souligne le fait que les stratégies de lutte biologique doivent être ciblées envers un hôte non infesté ou envers une petite population de pathogènes pour empêcher l'accumulation de maladies, plutôt que de lutter contre un niveau existant élevé de pathogènes.

Préparation du produit et transfert de la technologie :

Pour promouvoir la croissance de la cellule et le maintien de la population de microbes bénéfiques que l'on vaporise sur la surface de la feuille pendant l'élevage, on a mis au point une technique simple. On sélectionne l'eau du sol, qui a déjà des ingrédients du sol présents à l'état naturel comme vecteur, car cela soutient la croissance microbienne dans des conditions naturelles. On sélectionne ce vecteur sur la base de son efficacité, car il est facilement disponible et il ne coûte rien. On constate que le vecteur sélectionné n'interfère pas avec la croissance des bactéries désirées sur la surface de la feuille.

On a testé la technologie mise au point pendant quatre ans dans les Centres de Vulgarisation de la Recherche (REC) et dans les Stations Régionales de Recherche sur le Tasar (RTRS), qui travaillent dans les zones qui élèvent le tasar. Il est évident d'après les résultats des RECs (Tableau III) et des RTRS (Tableau IV) que la technologie est efficace dans tous les lieux d'élevage du tasar dans différents états. On a aussi réalisé un essai sur le terrain pendant quatre ans à plus grande échelle au niveau des fermiers dans différents états élevant le tasar en Inde, à savoir l'Andhra Pradesh, l'Orissa, le Chattisgarh, le Jharkhand, le Bengale Ouest, le Maharashtra et l'Uttar Pradesh. Il est évident d'après les résultats (Tableau V) que la manipulation de la population de bactéries bénéfiques sur la surface de la feuille à un niveau désiré, représente une alimentation saine et un environnement propice à la croissance du ver à soie dans la nature. Une diminution significative de la mortalité larvaire provoquée par les maladies virales (50,75 %) et bactériennes (63,25 %) entraîne une capacité de survie plus élevée des vers, qui contribue finalement à une production plus élevée de cocons tasar. La technologie est très utile au niveau des fermiers, grâce à l'amélioration conséquente de leur niveau existant de productivité des cocons qui passe de 17 à 20 cocons par ponte saine. L'impact de la technologie est plus pertinent au niveau des fermiers, compte tenu du fait que l'application des bactéries antagonistes contient efficacement les incidences à un niveau élevé des maladies virales et bactériennes. L'impact de la technologie a été constant pendant toutes les années dans tous les secteurs d'élevage du tasar

(Tableau VI). On a estimé un gain moyen de 15 cocons par ponte saine au niveau du terrain, qui peut rapporter un profit net de 1356 Rs. à un éleveur tassar, à partir de 100 pontes saines (Tableau VII).

TASAR EGG CARRYING AND INCUBATION DEVICE (TEC-AID), A SIMPLE TOOL FOR SCIENTIFIC HANDLING OF TASAR SEED

R. MANOHAR REDDY*, N. SURYANARAYANA & G. V. PRASAD**

Central Tasar Research & Training Institute, Central Silk Board, Nagari, Ranchi-835 303, [Jharkhand] India.

*Providing congenial environment during the silkworm egg transportation and embryonic development results in successful cocoon crop. It is much more important in tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. as the rearing is outdoor and the chances of exposure to unfavorable weather conditions is inevitable in most of the stages of its life cycle. However, the exposure of egg stage to outside conditions is not a compulsion and it can be handled systematically and scientifically. Though many attempts were made earlier on this line either to transport or to incubate the eggs, a model suitable for rural tribal tasar farmer by cost and maintenance wise was not evolved. The device presently developed is simple, portable, suitable both egg transportation/ incubation, protection from predators, it is non dependent of electric/ any other power, almost requires no skill and most importantly cost effective. The study with TEC-AID showed the maintenance of 23.1 °C to 28.4° C temperature and 78.5% to 92.1% relative humidity irrespective of ambient climatic conditions, which are very much congenial for silkworm egg i.e. from its production to hatching. The results also showed an average increase in hatching of tasar eggs by 9.41 % against controls and the enhanced rate of growth in larvae with 6.63 and 7.49 % during 1st and 2nd stages respectively over controls indicates the importance of incubation on the performance of the crop. By using the TEC-AID, optimal climate required can be provided while transporting the eggs from the grainage to rearer's house, while incubating at rearer's house and also while transporting the hatched larvae from rearer's house to rearing field and hence, the tool needs to be kept in immediate use for scientific and orderly handling of tasar seed to make tasar culture more remunerative.*

Keywords: *Antheraea mylitta*, Incubation, Relative humidity, Temperature, Egg transportation.

INTRODUCTION

Egg handling in tropical tasar culture has always been treated as yet another activity in spite of its critical importance and impact on the success of rearing. Incubation of silkworm eggs is a must for obtaining uniform hatching on a particular day (Krishnaswami, 1990; Narasimhanna, 1998). Incubation is an important step in protecting the activated silkworm egg before rearing (Gaur and Upadhyay 2001). The environment under which the eggs are protected has great influence on the development of the embryos, the uniformity in hatching, the health of the larvae and the performance of the crop in terms of yield (Ahsan *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1993; Astagi *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1994; Murali Krishna and Pavan Kumar, 1988; Meenal *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 2001; Vemananda Reddy *et al.*, 2003). To obtain maximum hatching, an optimal incubation temperature of 24 to 28° C and relative humidity of 75 to 85% should be provided till the egg pigmentation stage (Koundinya, 1989; Pavan Kumar, 2000; Vemananda Reddy *et al.*, 2003; Laxminarayana Reddy *et al.*, 2005). The

* Email: dr.manohar1959@rediffmail.com

**Research Extension Centre, CSR&TI, Central Silk Board, Rayachoty- 516 269 (AP)

temperature, humidity and light (5 lux) provided during incubation of silkworm egg has direct influence on initial weight of the larvae and their growth rate (Sivarami Reddy and Sasira Babu, 1990; Muniraju *et al.*, 1997). Improper transportation of silkworm eggs under fluctuating temperature and humidity cause embryo weakening, irregular hatching and hampering of larval growth (Niranjan Kumar and Thangavelu, 1993; Vineet Kumar *et al.*, 1995; Ojha *et al.*, 1996). Low humidity, particularly during hatching stage makes the chorion hard and thus the embryo cannot nibble it easily and emerge out (Vemananda Reddy *et al.*, 1997). The role of suitable devices for proper incubation of tasar egg, development of embryo and timely hatching without any adverse effect was studied (Rath *et al.*, 2002). In spite of various materials, methods and devices put into practice, none suits / covers all the steps of scientific handling of silkworm eggs in full. Among the traditional methods the consistent and required ecological / micro climatic conditions could not be provided for the full period of egg handling i.e. from production to hatching. The other scientific equipment in general are expensive, depends on electric power and cannot be used effectively in rural areas because of un-affordable cost, requirement of continuous power supply, operational skill etc. To suits the need, a simple but effective device for scientific handling of tasar silkworm seed has been fabricated. The device is electrically independent, needs almost no skill for operation, is portable and can handle the tasar seed from date of its production in the grainage or collection by the rearer to its hatching and transferring of hatched larvae on to its host plant in more scientific way.

MATERIALS AND METHODS

The TEC-AID is mainly comprises three parts and they are lower plastic tray, middle metal grill frame with wire mesh and upper gunny cloth cover / foam padded gunny cloth strips. The plastic tray of size 38.25 cm × 30.60 cm × 10.2 cm (Figs. 1 and 2) is to keep metal frame covered with gunny cloth while incubating the eggs indoor. The tray can store four (4) liters of water needed for the gunny cover (a) in upward capillary movement to keep the device as per required temperature and humidity. This middle metal frame is prepared by welding 6 mm iron rods as per the dimensions 30.6 × 15.3 × 25.5 cm (Figs. 1 and 2) with two apartments separated by middle frame and conical shaped lid. The legs of frame were fixed with plain round washers for stable resting in the tray or on the floor of the rearing field etc., and with cup shaped washers near bottom mesh fixed on reverse direction to fill with grease to avoid ants attack while transportation or while using in the rearing field. The mesh with 2.5 cm sieve size has been fixed on all sides, upper and lower surfaces of the metal frame. The lid was fixed to the main frame with hinges so as to open and close as per the requirement. Also the upper lid has provided with pad lock / hook for locking while transportation. The gunny cloth cover (a) fixed firmly on the outer surface of the metal frame (Figs. 1 and 2), the foam padded wet gunny cloth strips to put on inside bottom of the frame (b1) to put on the upper side of the lid (b2) with a slit in the middle to fit through the handle. The gunny cloth cover (a) will absorb water from the foam padded wet gunny cloth strip (b2) kept on the upper side of the lid and release to the rest of the gunny cloth while transporting the eggs and larvae. The wet foam padded gunny cloth strip (b1) kept on the lower part of metal frame also provides humidity while transporting eggs / larvae. The upper gunny cloth cover (a) has provided with velco strip to fix firmly on to the metal frame.

The requirement of material and cost of the TEC-AID for carrying and incubating a quantity of 300 Dfls (Table I) is only Rs.300=00. The other advantages are that, it can be fabricated locally and also can be modified as per the requirement based on the quantum of the eggs to be handled. Due to its longer life, easy handling, maintenance without electrical power and portability, the investment on the TEC-AID is meager when compared to cost benefit ratio.

The device can be operated (Figs. 1 and 2) with the sequence of dipping the foam padded gunny cloth strips (b1 and b2) of the unit in water for two minutes and keep (b1) in the lower surface of the metal frame and (b2) on upper surface of lid.

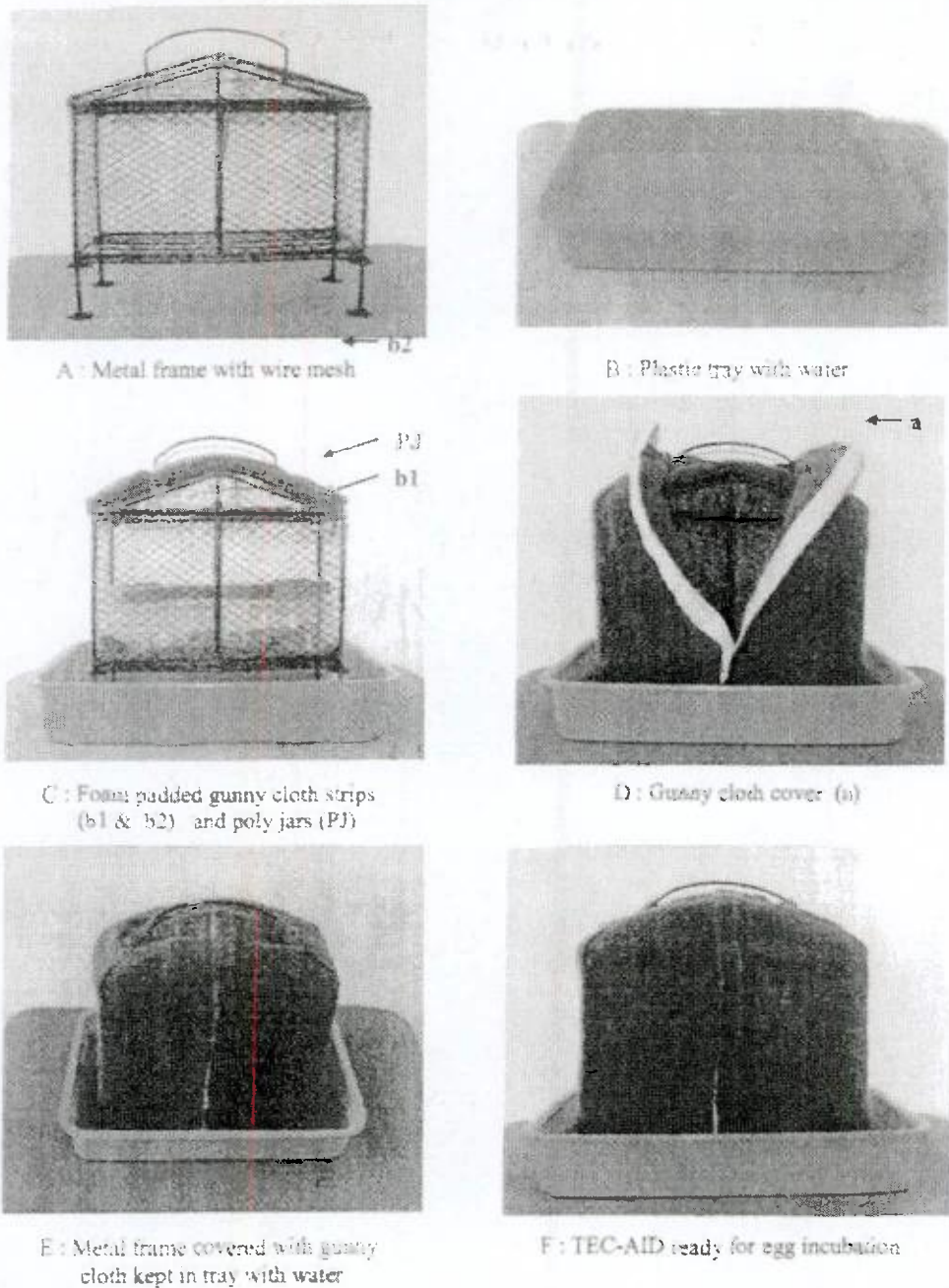


Fig. 1. Assembling of different parts of TEC-AID.

Fig. 1. Assemblage des différentes parties du TEC-AID.

A. Cadre en métal avec grillage. B. Plateau en plastique rempli d'eau. C. Bandes de toile de jute rembourrées en mousse (b1 et b2) et plusieurs bocaux (PJ). D. Housse en jute (a). E. Cadre en métal recouvert avec de la toile de jute placé dans un plateau rempli d'eau. F. TEC-AID prêt à l'incubation des œufs.

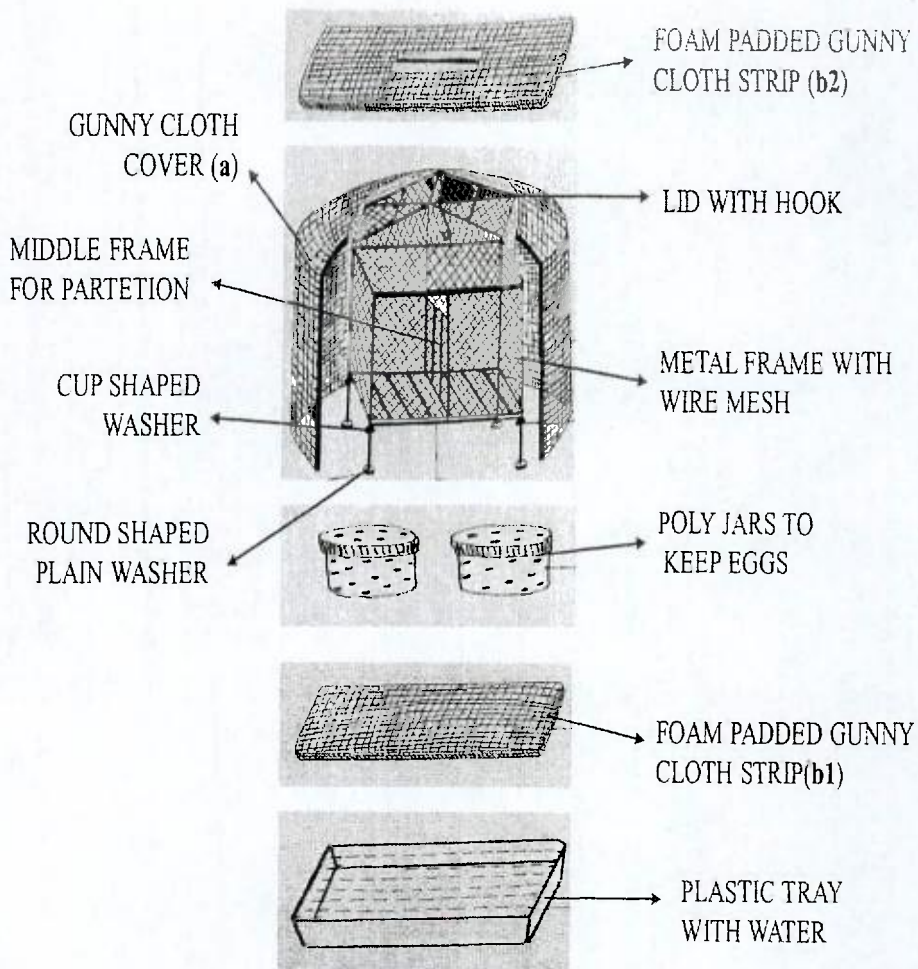
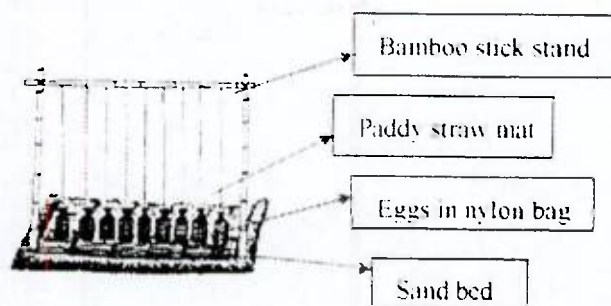


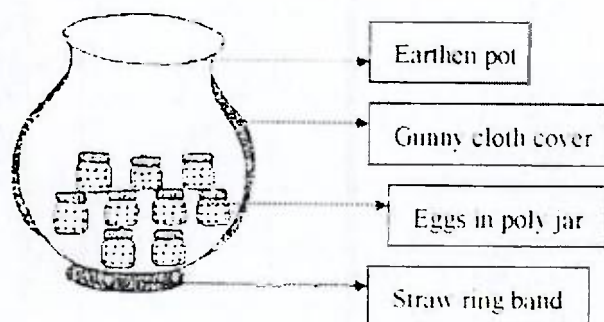
Fig. 2. Schematic diagram of TEC-AID.

Fig. 2. Schéma du TEC-AID.

III a. Sand bed with mat of paddy straw



III b. Earthen pitcher covered with wet gunny cloth



III c. Egg carrying basket

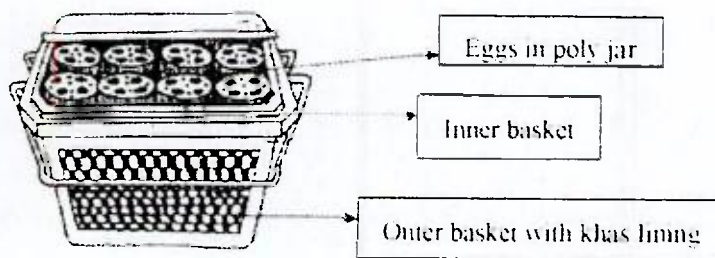


Fig. 3. Conventional tasar egg incubating devices.

3a. Sand bed with mat of paddy straw. 3b. Earthen pitcher covered with wet gunny cloth. 3c. Egg carrying basket.

Fig. 3. Systèmes conventionnels d'incubation des oeufs tasar.

3a. Litière de sable avec un tapis de paille de riz. 3b. Cruche en terre recouverte d'une toile de jute mouillée. 3c. Panier de transport des oeufs.

Apply grease in the cup shaped washers provided on the four sides to avoid the entry of ants when kept on the floor while transporting the eggs and in the rearing field. Keep the polythene bags or poly jars with tasar silkworm eggs in the two apartments of the metal frame, close the lid and lock it using pad lock / hook. Dip the gunny cloth cover (a) in water for 2 minutes and fix tightly on to the metal frame with velco strip. Apply some more water on the foam padded gunny cloth strip (b2) to refill the water lost during fixing the gunny cloth cover (a) over metal frame firmly. If the transportation duration is more than five hours, it is to remember to wet the gunny covers parts (a), (b1) and (b2) with water for maintaining optimal temperature and humidity inside the TEC-AID. After coming back home, remove the foam padded gunny cloth strips (b1 and b2), keep the entire unit in the plastic tray and pour water in the plastic tray up to ridge. Take care to see that the bottom edge of the gunny cloth cover (a) to dip in water correctly so as to absorb water for its upward movement by capillary action to keep TEC-AID as per required micro climate with temperature and humidity. The water in the plastic tray to be checked till the egg completes its incubation and reaches hatching stage. On the day of brushing again dip the foam padded gunny cloths strips (b1 and b2) in water and keep at respective places as explained above and carry the TEC-AID along with larvae to rearing field for brushing.

RESULTS AND DISCUSSION

The different conventional methods in practice are like **(a) Sand bed with mat of paddy straw:** a wet sand bed of about 15.3 cm thick on the floor of the rearer's house in one corner with wet paddy straw mat on it to keep eggs either on the mat or to hang over the mat with thread (Fig. 3a), **(b) Earthen pitcher covered with wet gunny cloth:** a wide mouthed earthen pitcher of 30-40 liters capacity kept upright on a straw band ring, with a small screen of thin gunny cloth tied to the neck allowed to rest on the body, contains perforated poly jars with eggs and the mouth tied with a nylon mosquito cloth (Fig. 3b) and **(c) Egg carrying basket:** with two plastic baskets one inside the other to keep perforated poly jars with eggs in inner basket harbored by the outer basket with a type of wet scented grass straw to maintain coolness and humid condition (Fig. 3c), are laborious to operate and not consistently effective. The decrease in temperature of 4.1 to 5.1 °C over conventional practices and 6.3 to 7.2 °C over normal condition and increase in relative humidity of 9.3 to 10.2 % over conventional practices and 38.1 to 39.8 % over normal condition (Table II) in TEC-AID, which is highly significant and indicates its potential in protecting the eggs totally from the adverse conditions.

The results show the efficiency of TEC-AID (Table II) in maintaining the required temperature and relative humidity (%) against the conventional practices and ambient climatic conditions. Tasar silkworm seed requires optimal temperature of 25-28°C and relative humidity of 75-85% during incubation for healthy embryogenesis, uniform hatching, robust and healthy larvae. High temperature of 30-40°C and varying relative humidity of 35 - 65% which prevail during the seasons of 1st, 2nd and 3rd crops of tasar silkworm rearing periods (June to September) and wide range of fluctuations on different days i.e. from day of laying to hatching of tasar silkworm eggs needs appropriate handling. The highest temperature and lowest relative humidity during day time will adversely affect the egg both indoor while preserving / incubating and outdoor while transporting. The fluctuations in temperature and relative humidity will shock the developing embryo and will lead to uneven development, poor hatching with weak larvae etc., and subsequently affecting the cocoon crop.

Further, the following characters are displayed by the TEC-AID: better efficiency: provides optimal and ideal climate to tasar silkworm egg irrespective of outside climate (ambient), the uniform micro climate: throughout incubation period helping healthy embryogenesis and larval health till they reaches its out-door rearing food plant, the safety: from all types of predators, the convenient features: like less weight, easy to carry, non-fragileness etc., the hygiene: as it is made up of simple materials like metal frame, plastic trays, gunny cloth etc., and disinfection with formalin, the easy operation: with almost no skill, electricity or any other power while transporting / incubation of eggs or newly

hatched larvae, the provision of light: as per the requirement with light penetration through gunny cloth, the durability: with metal frame, plastic tray and the gunny cloth and the multipurpose use: for egg transportation, egg incubation, newly hatched larval transportation and also to preserve food, water, vegetables by the rearers after the brushing of silkworm larvae indicates the efficiency of the device. Hence, with the use of TEC-AID, the optimal abiotic factors like temperature, relative humidity and light required for egg transportation and incubation can effectively be maintained with least cost by eliminating all the disadvantages encountered with conventional methods.

The hatching percentage and the rate of growth of chawki larvae (Table III) elucidate the impact of TEC-AID in improving the hatching of tasar eggs and enhancing the growth rate of tasar larvae by providing optimal micro climatic conditions during transportation and incubation.

Table I. Material requirement and fabrication cost of TEC-AID [300 Dfls capacity].

Tableau I. Besoin en matériels et coût de fabrication du TEC-AID (capacité de 300 pontes saines).

Material	Specification	Quantity*	Cost
<i>Matériel</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Quantité*</i>	<i>Coût (Rs.)</i>
Metal frame / <i>Cadre en métal</i>	6 mm iron rod @ Rs. 13 / m <i>tige de fer de 6 mm à raison de 13 Rs. / m</i>	4.575 m	60=00
Wire mesh / <i>Grillage</i>	5.1 cm sieve size @ Rs. 60 / m <i>maille de 5,1cm à raison de 60 Rs. / m</i>	0.5m	30=00
Plastic tray / <i>Plateau en plastique</i>	38.25 cm × 30.60cm × 10.2cm	1 no	60=00
Washers / <i>Lamelles</i>	Plain type / <i>Type simple</i>	4 nos	05=00
Washers / <i>Lamelles</i>	Cup type / <i>Type en godet</i>	4 nos	05=00
Red oxide (Primer) <i>Oxyde rouge (apprêt)</i>	Std. make <i>Fabrication standard</i>	50 ml	10=00
Black paint / <i>Peinture noire</i>	Std. make / <i>Fabrication standard</i>	100 ml	20=00
Gunny cloth / <i>Toile de jute</i>	Std. make / <i>Fabrication standard</i>	0.5 m	20=00
Foam pads / <i>Rembourrages en mousse</i>	Std. make / <i>Fabrication standard</i>	3.5 cm ²	10=00
Metal frame making charges / <i>Frais de construction de la structure en métal</i>	—	—	60=00
Gunny cloth stitching charges <i>Frais de couture de la toile de jute</i>	—	—	20=00

* The quantity of the material may vary depends upon the size of TEC-AID
La quantité de matériel peut varier en fonction de la taille du TEC-AID

Table II. Comparative performance of incubation devices on temperature and relative humidity.

Tableau II. Performance comparative des systèmes d'incubation en matière de température et d'humidité relative.

Type of Incubation device	Climatic conditions available			
Type de système d'incubation	Conditions climatiques présentes			
	Temperature		Relative humidity % % d'humidité relative	
	Max.	Min.	Max.	Min.
TEC-AID	28.4°C	23.1°C	92.1%	78.5%
Conventional practice / <i>Système conventionnel</i>	32.5°C	28.2°C	81.9%	69.2%
Normal condition / <i>Conditions normales</i>	34.7°C	30.3°C	52.3%	40.4%
Improvement over conventional practice <i>Amélioration par rapport au système conventionnel</i>	4.1°C	5.1°C	10.2%	9.3%
Improvement over normal condition <i>Amélioration par rapport aux conditions normales</i>	6.3°C	7.2°C	39.8%	38.1%

Table III. Comparative performance of hatching and chawki larval growth in TEC-AID over control.

Tableau III. Performance d'éclosion et croissance comparatives des jeunes larves entre le TEC-AID et le témoin.

Parameter	Preservation method		% improvement
	Control	TEC-AID	
Paramètre	Méthode de conservation		% d'amélioration
	Témoin	TEC-AID	
Hatching percentage <i>Pourcentage d'éclosion</i>	77.78 %	87.19 %	9.41 %
Larval rate of growth/ <i>Taux de croissance larvaire</i>			
(i) 1st age weight / <i>poids du 1er âge</i>	0.0181 g	0.0193 g	6.63 %
(ii) 2nd age weight / <i>poids du 2ème âge</i>	0.1870 g	0.2010 g	7.49 %

Table IV. Cost benefit ratio of TEC-AID.**Tableau IV. Rapport coût bénéfice du TEC-AID.**

Expenditure / returns (Rs) / <i>Dépenses / recettes (Rs)</i>	Conventional <i>Conventionnel</i>	TEC-AID
Hatching % / % d'éclosion	77.78	87.19
No. of larvae brushed for 100 Dfls (nos) <i>Nbre de larves levées pour 100 pontes saines</i>	15556	17436
No. of larvae brushed extra (nos) <i>Nbre supplémentaire de larves levées</i>	—	1880
No. of cocoons harvested @ 20% ERR (nos) <i>Nbre de cocons récoltés à raison de 20 % d'ERR</i>	3111	3487
No. of cocoons harvested extra (nos) <i>Nbre de cocons récoltés en plus (nbre)</i>	—	376
Returns @ Rs.1.50/= per cocoon (Rs) <i>Profits à raison de 1,50 Rs / par cocon (Rs.)</i>	4666=50	5230=50
Addl. returns for 2 crops @250 Dfls/crop@564/100 (Rs) <i>Profits supplémentaires pour 2 récoltes à raison de 250 pontes saines / récolte à raison de 564 Rs / 100 pontes saines</i>	—	2820=00
Profit= addl. Returns – cost of TEC-AID [2820 – 300] (Rs) <i>Profit = Recettes supplémentaires – coût du TEC-AID [2820 – 300] (Rs)</i>	—	2520=00
COST BENEFIT RATIO / RAPPORT COÛT BENEFICE = [300 : 2520] = 1 : 8.4		

The improvement of 9.41% in hatching percentage and 6.63% and 7.49% in the rate of growth of 1st and 2nd age chawki larvae is a significant positive change which can enhance the cocoon crop performance quantitatively and qualitatively with the usage of TEC-AID. The above results are in accordance with the earlier findings of Ahsan *et al.*, 1980; Koundinya, 1989; Sivarami Reddy and Sasira Babu, 1990; Singh *et al.*, 1993; Astagi *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1994; Murali Krishna and Pavan Kumar, 1988; Meenal *et al.*, 1994; Muniraju *et al.*, 1997; Pavan Kumar, 2000; Prasad *et al.*, 2001; Vemananda Reddy *et al.*, 2003; Laxminarayana Reddy *et al.*, 2005.

The cost benefit ratio (Table IV) indicates the potency of TEC-AID in making the crop success with additional brushed larvae, cocoon harvest and additional income to the rearers in tasar culture with meager one time investment on its cost. The additional brushed larvae of 1880, additional cocoon harvest of 376 and additional returns of Rs.564=00 per 100 DFLs and at an average of 250 DFLs rearing capacity of the farmer and minimum of 2 crops in a year amounting to Rs.2520=00 as net additional income excluding the cost of TEC-AID with cost benefit ratio 1:8.4, which indicates the colossal advantage of the tool for the betterment of tasar farmers and the industry.

CONCLUSION

The TEC-AID tool is simple, scientific, multipurpose, cost effective, durable, eco friendly and affordable by poor farmers for its easy maintenance and electrically independent nature. The transportation and incubation of eggs are effortless and safe as the device is portable, hygienic and prevents the predators. The hatching of eggs is high and uniform, as the device safeguards eggs during transportation, incubation against the adverse climates. Hence, the tool needs to be kept in immediate use for scientific and orderly handling of tasar seed to make tasar culture more remunerative.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Mrs.R.Sudha Reddy and Sri M. M. Reddy for their timely assistance in fabrication and evaluation study of the tool.

REFERENCES

- AHSAN,M.M., KHATRI.R.K., NARASIMHANNA.M.N. (1980), Studies on egg laying in tasar silkworm (*Antheraea mylitta*) under different conditions, *Annual report*, CTR&TI, Ranchi, pp.29-30.
- ASTAGI,S.G., SRINIVASABABU.G.K., THANGAVELU.K. (1996), Low cost earthen pot incubator, *Indian silk*, 35 (2&3): 29-31.
- DUBEY,O.P., JAYASWAL.J., THANGAVELU.K. (1994), Studies on the bionomics of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D (Lepidoptera : Saturniidae). I. Effect of abiotic factors on egg hatchability and hatching period, *J. Adv. Zool.* 15(1): 49-54.
- GAUR,K.P., UPADHYAY.V.B. (2001), Effect of ecological factors on the hatchability of *Bombyx mori* Linn eggs, *J. Adv. Zool.* 22(1): 18-21.
- KOUNDINYA,P.R. (1989), Techniques of management of tasar grainage, *Indian silk*, 28 (2): 24-26.
- KRISHNASWAMI,S. (1990), Improved method of rearing young age (Chawki) silkworms, Bulletin, Central Silk Board, Bangalore, India.
- LAXMINARAYANA REDDY,P., SANKAR NAIK.S., SIVARAMI REDDY .N. (2005), Implications of high temperature and low humidity on the hatching in the silkworm, *Bombyx mori* L. under LD 12:12 conditions, *Int.J.Indus.Entomol.* 11(2): 139-143.
- MEENAL,A., MATHUR.V.B., RAJAN.R.K. (1994), Role of light during incubation of silkworm eggs and its effect on rearing performance and diapauses, *Indian J. Seric.* 33(2): 139-141.
- MUNIRAJU.E., SEKHARAPPA.B.M., RAGHURAMAN.R. (1997), Egg incubation and its impact on larval development, *Indian silk*, 36 (6): 10-14.
- MURALI KRISHNA,CH., PAVAN KUMAR.T. (1988), Low Cost Incubation Chamber (LCIC) – an economically viable unit, *Indian silk*, 26 (10): 73-79.
- NARASIMHANNA,M.N. (1998), Manual on silkworm egg production, Central Silk Board, Bangalore, India.
- NIRANJAN KUMAR ., THANGAVELU K. (1993), Strategies in egg protection in tasar culture, *Indian silk*, 35 (8&9): 29-31.
- OJHA,N.G., SINGH.M.K., SARAN.S.K., SINHA.B.R.R.PD., SINHA.S.S. (1996), Tropical tasar egg transportation basket, *Indian silk*, 35 (2&3): 27-28.
- PAVAN KUMAR,T. (2000), Low cost incubation chamber (LCIC). Bulletin, National Silkworm Seed Project, Central Silk Board, Bangalore, India.
- PRASAD,G.V., SURYANARAYANA.N., DATTA, R.K. (2001), Hydro-dynamic incubator : A new device for incubation of silkworm eggs during summer, *Indian Silk*, 40(4): 7-9.
- RATH,S.S., NEGI.B.B.S., SINHA.B.R.R.P., THANGAVELU.K. (2002), Low cost incubator for *Antheraea mylitta* eggs : Efficacy of the devices, *Bull. Ind. Acad. Seri.* 6(2): 61-66.
- SINGH,M.K., JAISWAL.J., THANGAVELU.K. (1993), Ideal tasar grainage house and grainage techniques, *Indian silk*, 31 (12): 21-26.

- SIVARAMI REDDY,N., SASIRA BABU.K. (1990), Hatching patterns in the silkworm *Bombyx mori* L (PMxNB4D2) under different photoperiodic conditions, *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)*, 99: 327-334.
- VEMANANDA REDDY,G., VIJAYALAKSHMI RAO., SAMSON .M.V. (1997), Silkworm egg handling techniques, *Indian silk*, 36 (1): 15-17.
- VEMANANDA REDDY,G., RAO.V.L., KAMBLE .C.K. (2003), Fundamentals of silkworm egg, *Bombyx mori* L. Silkworm Seed Technology Laboratory, Central Silk Board, Bangalore, India.
- VINEET KUMAR., SINGH.G.P., KAMBLE.C.K. (1995), A simple device for silkworm egg transportation, *Indian silk*, 34 (7): 27-28.

SYSTEME DE TRANSPORT ET D'INCUBATION DES ŒUFS TASAR (TEC-AID), UN OUTIL SIMPLE POUR LA MANIPULATION SCIENTIFIQUE DES GRAINES TASAR

R. MANOHAR REDDY*, N. SURYANARAYANA & G. V. PRASAD**

Central Tasar Research & Training Institute, Central Silk Board, Nagari, Ranchi 835 303,
[Jharkhand], Inde.

*L'apport d'un environnement propice pendant le transport des oeufs de ver à soie et pendant le développement embryonnaire donne une récolte de cocons réussie. Il est bien plus important chez le ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D., puisque l'élevage a lieu à l'extérieur et que les risques d'exposition à des conditions météorologiques défavorables sont inévitables pendant la plupart de ses cycles de vie. Cependant, l'exposition du stade de l'œuf à des conditions extérieures n'est pas obligatoire et on peut s'en occuper de manière systématique et scientifique. Bien que de nombreux essais aient été faits précédemment dans ce sens, soit pour transporter ou pour incuber les œufs, on n'a pas mis au point de modèle adapté pour le fermier tasar rural et tribal, du point de vue du coût et de l'entretien. Le système que l'on a mis au point est simple, portable, adapté à la fois au transport / à l'incubation des oeufs, à la protection par rapport aux prédateurs, il ne dépend pas de l'électricité ou d'une autre énergie, ne nécessite presque aucune compétence et de manière plus importante, il est bon marché. L'étude avec le TEC-AID montre le maintien d'une température de 23,1° C à 28,4° C et d'une humidité relative de 78,5 à 92,1 %, quelles que soient les conditions climatiques ambiantes, qui conviennent très bien à l'œuf du ver à soie, de la production à l'éclosion. Les résultats montrent aussi une augmentation moyenne de l'éclosion des œufs tasar de 9,41 % par rapport aux témoins et une amélioration du taux de croissance des larves de 6,63 et 7,49 % pendant respectivement les 1^{er} et 2^{ème} âges par rapport aux témoins, ce qui indique l'importance de l'incubation par rapport à la performance de récolte. Le TEC-AID fournit un climat optimal pendant le transport des œufs du centre de grainage à la magnanerie, pendant l'incubation des œufs dans la magnanerie, ainsi que pendant le transport des larves écloses de la magnanerie au terrain d'élevage et il faudrait donc que cet outil soit utilisé sans délai pour la manipulation scientifique et méthodique de la graine tasar pour que l'élevage du tasar devienne plus rémunérateur.*

INTRODUCTION

On a toujours traité la manipulation de l'œuf dans l'élevage du tasar tropical comme une activité de plus, malgré son importance critique et son impact sur le succès de l'élevage. L'incubation des œufs de ver à soie est obligatoire pour obtenir une éclosion uniforme un jour particulier (Krishnaswami, 1990 ; Narasimhanna, 1998). L'incubation est une étape importante pour protéger l'œuf de ver à soie activé avant l'élevage (Gaur et Upadhyay, 2001). L'environnement dans lequel les œufs sont protégés a une grande influence sur le développement des embryons, l'uniformité de l'éclosion, la santé des larves et la performance de récolte en termes de rendement (Ahsan et coll., 1980 ; Singh et coll., 1993 ; Astagi et coll., 1996 ; Dubey et coll., 1994 ; Murali Krishna et Pavan Kumar, 1988 ; Meenal et coll., 1994 ; Prasad et coll., 2001 ; Vemananda Reddy et coll., 2003). Pour obtenir l'éclosion maximum, il faut apporter une température d'incubation optimale de 24 à 28° C et

* Email : dr.manohar1959@rediffmail.com

** Research Extension Centre, CSR&TI, Central Silk Board, Rayachoty – 516 269 (AP)

une humidité relative de 75 à 85 % jusqu'au stade de pigmentation de l'œuf (Koundinya, 1989 ; Pavan Kumar, 2000 ; Vemananda Reddy et coll., 2003 ; Laxminarayana Reddy et coll., 2005). La température, l'humidité et la lumière (5 lux) que l'on apporte pendant l'incubation de l'œuf du ver à soie ont une influence directe sur le poids initial des larves et sur leur taux de croissance (Sivarami Reddy et Sasira Babu, 1990 ; Muniraju et coll., 1997). Le transport incorrect des œufs de ver à soie avec une température et une humidité fluctuantes entraîne l'affaiblissement de l'embryon, une éclosion irrégulière et gêne la croissance de la larve (Niranjan Kumar et Thangavelu, 1993 ; Vineet Kumar et coll., 1995 ; Ohja et coll., 1996). La faible humidité particulièrement pendant les stades de l'éclosion rend le chorion dur et l'embryon ne peut pas le grignoter facilement et éclore (Vemananda Reddy et coll., 1997). On a étudié le rôle de systèmes adaptés pour une incubation de l'œuf tassar et un développement de l'embryon corrects et une éclosion en temps voulu sans aucun effet négatif (Rath et coll., 2002). Bien qu'on ait eu recours à des matériaux, des méthodes et des systèmes variés, aucun n'est adapté ou ne couvre complètement toutes les étapes de la manipulation scientifique des œufs de ver à soie. Les méthodes traditionnelles n'apportent pas les conditions écologiques / microclimatiques constantes et nécessaires pendant toute la période de manipulation de l'œuf, c'est-à-dire de la ponte à l'éclosion. En général, les autres équipements scientifiques sont chers, dépendent du courant électrique et on ne peut pas les utiliser efficacement dans les zones rurales car ils sont inabordables, nécessitent un apport continu en source d'énergie, des compétences opérationnelles, etc... Pour répondre aux besoins, on a fabriqué un système simple mais efficace pour la manipulation scientifique de la graine du ver à soie tassar. Le système ne dépend pas de l'électricité, ne nécessite presque aucune compétence, est portable et permet de gérer les graines tassar à partir de leur date de production dans le centre de grainage ou à partir du recueil par l'éleveur, jusqu'à leur éclosion et au transfert des larves écloses sur leurs plantes hôtes d'une façon plus scientifique.

MATERIELS ET METHODES

Le TEC-AID est principalement composé de trois parties : d'un plateau inférieur en plastique, d'une charpente centrale avec un grillage métallique, d'une housse externe en toile de jute / et de bandes de toile de jute avec un rembourrage en mousse. Le plateau de plastique d'une taille de 38,25 cm × 30,60 cm × 10,2 cm (Figs. 1 et 2) permet de poser la charpente métallique recouverte de toile de jute, pendant l'incubation des œufs à l'intérieur. Le plateau peut stocker quatre (4) litres d'eau pour humidifier la housse de toile de jute (a) dans un mouvement capillaire vers le haut pour maintenir le système à la température et à l'humidité requises. On prépare cette charpente centrale métallique en soudant des tiges de fer de 6 mm en fonction des dimensions de 30,6 cm × 15,3 cm × 25,5 cm (Figs. 1 et 2) avec deux compartiments séparés par une partition médiane et un couvercle conique. On équipe les pieds de la charpente avec des lamelles rondes simples pour la stabilité du plateau et avec des lamelles en forme de godet près du fond en grillage, fixées dans le sens inverse, qu'il faut enduire de graisse pour éviter les attaques par les fourmis, pendant le transport ou pendant l'utilisation dans le champ d'élevage. On place un grillage avec des mailles de 2,5 cm sur tous les côtés, sur les surfaces supérieure et inférieure de la charpente métallique. On fixe le couvercle sur la charpente principale avec des gonds de manière à ouvrir et fermer en fonction des besoins. On équipe aussi le couvercle supérieur avec un cadenas / une poignée pour le fermer pendant le transport. On fixe fermement la housse de toile de jute (a) sur la surface externe de la charpente métallique (Figs. 1 et 2), les bandes de toile de jute humides rembourrées à placer sur le fond intérieur de la charpente (b1) sur le côté supérieur du couvercle (b2) avec une fente au milieu pour adapter la poignée. La housse de toile de jute (a) absorbe l'eau de la bande de toile de jute rembourrée mouillée (b2) placée sur le côté supérieur du couvercle, qui se diffuse au reste de la toile de jute pendant le transport des œufs et des larves. La bande de toile de jute mouillée rembourrée (b1) placée sur la partie inférieure de la charpente métallique apporte aussi de l'humidité pendant le transport des œufs / des larves. On équipe la housse supérieure en toile de jute de bandes velcro pour la fixer fermement sur la charpente métallique.

Le matériel nécessaire au TEC-AID pour le transport et l'incubation de 300 pontes saines (Tableau I) ne coûte que 300 Rs. Il a aussi l'avantage de pouvoir être fabriqué localement et d'être modifié en fonction de la quantité d'œufs à traiter. Compte tenu de sa longue durée de vie, de sa manipulation facile, de son fonctionnement sans énergie électrique et du fait qu'il soit portable, l'investissement pour le TEC-AID est peu élevé par comparaison au ratio coût bénéfice.

On peut se servir du système (Fig. 1 et 2) dans l'ordre suivant : tremper les bandes de toile de jute rembourrées (b1 et b2) dans l'unité d'eau pendant deux minutes et les placer (b1) sur la surface inférieure de la charpente métallique et (b2) sur la surface supérieure du couvercle.

Appliquer de la graisse dans les lamelles en forme godet fournies sur les quatre côtés pour éviter que les fourmis ne rentrent, lorsqu'on pose le TEC-AID sur le sol pendant le transport des œufs et sur le terrain d'élevage. Conserver les sacs en plastique ou les différents bocal contenant les œufs de ver à soie dans les deux compartiments de la charpente métallique, fermer le couvercle et le verrouiller avec le cadenas / la poignée. Tremper la housse de toile de jute (a) dans l'eau pendant 2 minutes et la fixer étroitement sur la charpente métallique avec une bande en velcro. Appliquer plus d'eau sur la bande de toile de jute rembourrée en mousse (b2) pour compenser la perte d'eau lors de la fixation de la housse en toile de jute (a) sur la charpente métallique. Si la durée du transport est de plus de cinq heures, il ne faut pas oublier d'humidifier les parties de toile de jute (a), (b1) et (b2) pour maintenir la température optimale et l'humidité à l'intérieur du TEC-AID. De retour chez soi, retirer les bandes de toile de jute rembourrées (b1 et b2), conserver l'unité entière dans le plateau en plastique et verser de l'eau dans le plateau en plastique jusqu'à ras bord. S'assurer de tremper correctement la partie inférieure de la housse de toile de jute (a) de manière à ce qu'elle absorbe l'eau dans un mouvement vers le haut par action capillaire pour conserver le TEC-AID dans le microclimat de température et d'humidité nécessaires. Vérifier le niveau d'eau dans le plateau en plastique jusqu'à ce que l'œuf ait terminé son incubation et ait atteint le stade de l'éclosion. Le jour de la levée, tremper à nouveau les bandes de toile de jute rembourrées en mousse (b1 et b2) dans l'eau et les placer dans les endroits respectifs en suivant les explications fournies plus haut et transporter le TEC-AID avec les larves jusqu'au champ d'élevage pour la levée.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans la pratique les différentes méthodes conventionnelles sont **a) La litière de sable avec un tapis de paille de riz** : une litière de sable humide d'environ 15,3 cm d'épaisseur sur le sol de la magnanerie dans un coin avec un tapis de paille de riz humide pour conserver les œufs soit sur le tapis ou suspendus au-dessus du tapis avec un fil (Fig. 3a), **b) Une jarre en terre recouverte de toile de jute mouillée** : un pichet en terre avec un grand goulot d'une capacité de 30 à 40 litres maintenu debout sur un anneau en bandes de paille, avec une petite épaisseur de toile de jute fine attaché autour du col recouvrant l'ensemble du pichet, contenant plusieurs bocal perforés avec les œufs et dont on attache le goulot avec un tissu de moustiquaire en nylon (Fig. 3 b) et **(c) Un panier pour transporter les œufs** : avec deux paniers en plastique l'un à l'intérieur de l'autre pour conserver plusieurs bocal perforés contenant les œufs dans le panier intérieur protégé par le panier extérieur, avec de la paille d'herbe mouillée pour maintenir la fraîcheur et l'humidité (Fig. 3c). Le fonctionnement de ces systèmes n'est pas facile et ils ne sont pas toujours efficaces. La baisse de la température de 4,1 à 5° C par rapport aux pratiques conventionnelles et de 6,3 à 7,2° C par rapport aux conditions normales et l'augmentation de l'humidité relative de 9,3 à 10,2 % par rapport aux pratiques conventionnelles et de 38,1 à 39,8 % par rapport aux conditions normales (Tableau II) avec le TEC-AID, sont très significatives et indiquent son potentiel à protéger totalement les œufs des conditions néfastes.

Les résultats montrent l'efficacité du TEC-AID (Tableau II) pour le maintien de la température et l'humidité relative requises (%) par rapport aux pratiques conventionnelles et aux conditions climatiques environnantes. La graine de ver à soie tassar a besoin d'une température optimale de 25 à 28° C et d'une humidité relative de 75 à 85 % pendant l'incubation pour une embryogenèse saine,

une éclosion uniforme, des larves robustes et saines. La température élevée de 30 – 40° C et l'humidité relative variable de 35 à 65 %, qui dominent pendant les saisons des 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} récoltes pendant les périodes d'élevage du ver à soie tassar (de juin à septembre) et une grande fourchette de fluctuations selon les jours, c'est-à-dire, du jour de la ponte jusqu'à l'éclosion des œufs de ver à soie tassar, nécessitent une manipulation appropriée. La température la plus élevée et l'humidité relative la plus faible pendant la journée ont un effet défavorable sur l'œuf, à la fois à l'intérieur pendant la conservation / l'incubation et à l'extérieur pendant le transport. Les fluctuations de la température et de l'humidité relative font subir un choc à l'embryon en développement et entraînent un développement inégal, une mauvaise éclosion avec des larves faibles, qui ont par la suite une incidence sur la récolte de cocons.

Par ailleurs, le TEC-AID présente les caractéristiques suivantes : efficacité supérieure, apport d'un climat optimal et idéal pour l'œuf de ver à soie tassar, quel que soit le climat extérieur (ambiant), d'un microclimat uniforme : pendant toute la période d'incubation, il permet une embryogenèse saine et la santé de la larve jusqu'à ce qu'elle soit placée sur sa plante hôte pour l'élevage à l'extérieur, la sécurité : par rapport à tous les types de prédateurs, un caractère pratique : plus léger, facilité de transport, absence de fragilité, etc. hygiène : puisqu'il est fait à partir de matériaux simples, tels qu'une charpente en métal, un plateau en plastique, de la toile de jute etc. et désinfection avec de la formaline et manquement facile : il ne nécessite presque aucune compétence, ni l'électricité ou d'autre énergie pendant le transport / l'incubation des œufs ou des larves venant d'éclore, apport de lumière : d'après les besoins avec la pénétration de la lumière par la toile de jute, durabilité : la charpente en métal, le plateau en plastique et la toile de jute permettent des usages multiples : pour le transport des œufs, l'incubation des œufs, le transport des larves venant d'éclore et la conservation de la nourriture et de l'eau, des légumes par les éleveurs après la levée des larves de ver à soie. L'utilisation du TEC-AID, permet donc de maintenir efficacement les facteurs abiotiques optimaux comme la température, l'humidité relative et la lumière nécessaires au transport et à l'incubation des œufs à moindre coût et en éliminant tous les inconvénients que l'on rencontre avec les méthodes conventionnelles.

Le pourcentage d'éclosion et le taux de croissance des larves chawki (Tableau III) montre l'impact du TEC-AID dans l'amélioration de l'éclosion des œufs tassar et du taux de croissance des larves tassar grâce à l'apport de conditions micro-climatiques optimales pendant le transport et l'incubation.

L'amélioration du taux d'éclosion de 9,45 % et du taux de croissance de 6,63 % et de 7,49 % chez les larves chawki du 1^{er} et du 2^{ème} âge est un changement positif significatif, qui peut améliorer la performance de récolte en cocons sur le plan quantitatif et qualitatif grâce à l'utilisation du TEC-AID. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents d'Ahsan et coll., 1980 ; Koundinya, 1989, de Sivarami Redy et Sasira Babu, 1990 ; de Singh et coll., 1993 ; d'Astagi et coll., 1996 ; de Dubey et coll., 1994 ; de Murali Krishna et de Pavan Kumar, 198 ; de Meenal et coll., 1994 ; de Muniraju et coll., 1997 ; de Pavan Kumar, 2000 ; de Prasad et coll., 2001 ; de Vemananda Reddy et coll., 2003 ; de Laxminarayana Reddy et coll., 2005.

Le ratio coût – bénéfice (Tableau IV) montre que le TEC-AID contribue au succès de la récolte en permettant de lever plus de larves, de récolter plus de cocons et en apportant des revenus supplémentaires aux éleveurs tassar, avec un faible investissement unique. Les 1880 larves supplémentaires, la récolte de 376 cocons supplémentaires et les profits supplémentaires de 564 Rs pour 100 pontes saines, avec une capacité moyenne d'élevage de 250 pontes saines pour le fermier et un minimum de 2 récoltes par an, qui représentent un revenu net supplémentaire de 2520 Roupies, en excluant le coût du TEC-AID, avec un ratio coût – bénéfice de 1 : 8,4, montrent que c'est un système très avantageux, qui représente une amélioration pour les fermiers et pour l'industrie tassar.

CONCLUSION

Le système du TEC-AID est simple, scientifique, a plusieurs utilités, est bon marché, durable, écologique et abordable pour les fermiers pauvres car il est d'un entretien facile et ne dépend pas de l'électricité. Le transport et l'incubation des œufs sont faciles et sûrs, puisque le système est portable, hygiénique et permet d'éviter les prédateurs. L'éclosion des œufs est élevée et uniforme, puisque le système protège les œufs des climats hostiles pendant le transport et l'incubation. Il faudrait que cet outil soit mis immédiatement en utilisation pour la manipulation scientifique et méthodique de la graine tasar et pour rendre l'élevage tasar plus rémunérateur.

DIFFERENTIAL SCREENING FOR SALINITY TOLERANCE IN HIGH YIELDING INDIAN MULBERRY, *MORUS INDICA* GENOTYPES

SHALINI LAL AND PARAMJIT KHURANA

Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi South Campus, Dhaula Kuan, New Delhi-110021, India. Email: param@genomeindia.org

*Salt tolerance is a complex trait involving the coordination of cellular, osmotic and ionic responses at the whole plant level. Plants exposed to salt stress undergo changes in response to their environment causing premature senescence and reduction in the photosynthetic area. Thus, genotypic diversity needed to breed for increased resistance to salinity is best investigated under long term exposures to salinity. In the present investigation, effect of simulated salt stress was studied on the growth of some popular cultivars of *Morus indica* under salinity stress and compared with that of a salt tolerant genotype, S34. Parameters taken into consideration were free proline accumulation, photosynthetic yield, nitrate reductase (NR) activity, Cellular Membrane Stability (CMS), Relative Water Content (RWC) and carbon isotope discrimination. Under simulated salt stress, Cumulative Salinity Susceptibility Index (C-SSI) for each genotype suggests that RFS 175 and S34 are tolerant towards salinity and K2 appears to be the most salt sensitive cultivar. Tolerance to high soil salinity involves different processes and is manifested in a wide range of specialization at different levels of organization such as gross morphology, membrane transport, cellular biochemistry and gene transcription.*

Keywords: Cellular Membrane Stability (CMS), Cumulative Salinity Susceptibility Index (C-SSI), F_v/F_m , Nitrate Reductase (NR), Relative Water Content (RWC), Water Use Efficiency (WUE).

INTRODUCTION

Mulberry forms the basic food material for silkworms and the backbone of the entire silk industry worldwide. Plants perceive osmotic stress: resulting in reduction of growth, followed by a gradual recovery to a newer and reduced rate of growth (Munns, 2002). Plants thus show two phasic growth response to salinity. While for the first phase of growth reduction, there is surprisingly little genotypic variation, growth in the second phase is reduced due to internal cytoplasmic injury caused by the accumulation of ions. The inherent ability to exclude ions from the cytoplasm is thus the key to survival under long-term salinity conditions. In fact, salt tolerant varieties have been generally observed to develop efficient mechanisms to compartmentalize ions before they become toxic to the plant. Tolerance to drought and salinity is an important character to be associated with other desirable characters like leaf quality in tropical and semi-arid regions where mulberry is cultivated. Therefore, screening of mulberry germplasm for salt and drought stress would be highly desirable.

Proline is one of the well known hallmarks of stress and its levels are found to increase under osmotic stress. It may act as organic nitrogen reservoir that can be utilized during recovery from stress (Sairam and Tyagi 2004). Another key player in the nitrogen assimilation is nitrate reductase and its enzyme activity together with photosynthetic efficiency can be used as good cellular indicators of salinity stress. Salinity stress apart from imparting Na^+ toxicity to the plant, has also a secondary effect like water deficiency/depletion (Munns, 2002) which has been considered as one of the most common

and serious consequence of salinity (Tabaei-Aghadaei *et al.*, 2000) resulting in malfunctioning of cellular membranes by increasing their permeability to ions and electrolytes. Hence the estimation of membrane dysfunction under stress by measuring cellular electrolyte leakage from affected leaf tissue is also finding growing use as a measure of Cellular Membrane Stability (CMS) and as a screen for stress resistance. In order to gain an insight into the salt tolerance aspects of mulberry, in this paper we report the comparative analysis of the tolerance potential among different cultivars of mulberry, based on osmolyte accumulation, membrane stability, nitrogen assimilation and photosynthetic efficiency.

Additionally, carbon isotope ratio $\delta^{13}\text{C}$ has been proposed as an indirect selection criterion for water use efficiency. Water Use Efficiency (WUE) is defined as the ratio of dry matter produced to total photosynthesis during a specific growth period. Plants discriminate against ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) during photosynthesis and the extent of this discrimination shows a strong inverse relationship with WUE in several field crops, i.e. wheat (Farquhar and Richards, 1984; Monneveux *et al.* 2006), cowpea (Udaykumar *et al.*, 1998), cotton (Saranga *et al.*, 1999), and *Beta vulgaris* (Bloch *et al.*, 2006). The main objective of this study was to determine whether there was variation amongst the cultivars of mulberry in their response to salinity tolerance and water use efficiency by screening for $\delta^{13}\text{C}$.

MATERIAL AND METHODS

1. Plant material and stress treatments:

In the present investigation efforts have been made to study the effect of salinity on the potted plants of various cultivars of *Morus indica*. Cuttings from five to seven years old plants of equal lengths and diameter with approx. 3-4 buds of *M. indica* var. K2, S1, S34, S13 and RFS175 were established in 20/25 cm earthen pots. The pots were watered daily and maintained under natural conditions in the departmental field South Campus, (Delhi University). After 3 months, when plants had successfully established in the pots as evident from the new growth pattern, they were given salinity treatment. The plants were subjected to two conditions, control (T_0) and one salinity treatment (T_1) where $T_1 = 100 \text{ mM NaCl}$ for 15 days every alternate day. After a fixed period 3rd and 4th leaves were taken and analysed for membrane stability, proline and chlorophyll contents, photosynthetic yield, relative water content and nitrate reductase activity.

2. Relative Water Content (RWC):

For determination of RWC, fresh leaves were detached from plants for each treatment and genotype and weighed immediately to record fresh weight (FW), followed by dipping them in distilled water for 12 h. The leaves were blotted to wipe off excess water, weighed to record turgid leaf weight (TW), and subjected to oven drying at 70°C for 24 h to record dry weight (DW). The RWC was determined by the equation $[(\text{FW}-\text{DW}) \times 100]/[\text{TW}-\text{DW}]$.

3. Cell Membrane Stability Index (CMS):

CMS was determined according to the method of Foker *et al.* (1998). For this purpose a fully expanded young leaf was selected and cut into pieces which were submerged into distilled water in the test tubes. The tubes were kept at 30°C for 30 min and conductivity measured (C_1). The leaf samples were then autoclaved for 15 min and electrical conductivity measured again (C_2) in the supernatant. CMS was determined using the equation $\{1-(C_1/C_2)\}$.

4. Proline Estimation:

Proline concentration was determined spectrophotometrically according to Bates *et al.* (1973). Fresh leaves (500 mg) were homogenized in 10 ml of 3 % sulphosalicylic acid. Optical Density of the extract was recorded at 520 nm.

5. Nitrate Reductase Activity:

Fully expanded leaves were incubated in 5 ml of assay buffer containing 5 % n-propanol, 0.1 M potassium phosphate buffer and 0.2 M KNO₃ at 30°C for 60 min under anaerobic conditions in dark (Silveira *et al.*, 2001). The reaction was stopped by keeping the tubes in boiling water. To assay nitrite formation, 1 ml of sulphanilamide (1 % in 1 N HCl) and 1 ml of 0.02 % aqueous solution of N-1-naphthyl-ethylenediamine was added to 0.5 ml of reaction mixture. After 20 min, 2.5 ml of water was added and absorbance recorded at 540nm.

6. Measurement of Photosynthetic Yield:

Chlorophyll fluorescence was measured at room temperature with a portable fluorometer (PAM-210, Walz, Germany). The minimal fluorescence level (F_0) with all PSII reaction centres open was estimated by measuring the modulated light, which was sufficiently low. The maximal fluorescence level (F_m) with all PSII reaction centres closed was determined by a 0.8s saturating pulse at 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in dark adapted leaves. Photosynthetic yield was measured as F_v/F_m where $F_v = F_m - F_0$. Then leaves were illuminated by an actinic light of 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. When the leaf reached a steady state photosynthesis, the steady state fluorescence (F_t) was recorded and a second 0.8s saturating pulse at 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was given to determine the maximal fluorescence (F_m') in the light adapted state. The actinic light was then turned off, the minimal fluorescence in the light adapted (F_0') was determined by illumination with far red light. The level of intrinsic efficiency was measured as $\Phi\text{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$. (Maxwell and Johnson, 2000)

7. Measurement of Carbon Isotope Discrimination.:

Leaves for each genotype were oven-dried, and ground to fine powder. Analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ was carried out by isotope ratio mass spectrometry (IRMS) at the National Facility for Stable Isotope Studies in Biological Sciences, UAS, Bangalore. Carbon isotope composition computed as $[(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$, where R was the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, and the ratio was expressed as $\delta^{13}\text{C}$ (‰) (Farquhar *et al.*, 1989).

8. Salinity Susceptibility Index (SSI):

Salinity Susceptibility Index (SSI) was calculated for each genotype as: $\text{SSI} (\%) = 1 - (\text{XT} / \text{XC}) \times 100$, where XT is the mean value (computed for three samples) of the parameters measured under salinity conditions and XC is the mean value of parameters measured under control conditions.

9. Statistical Analysis:

The effect of salinity and difference among different genotypes were assessed using a Two-way ANOVA (analysis of variance) for two factors. Each parameter was analysed individually. Means were computed over the three plants and used as data values in the analyses.

RESULTS

The present investigation reveals that susceptibility to salt differs among the five mulberry cultivars and there is a difference in molecular responses towards salinity stress which can be due to genetic variability amongst varieties. Results from this study indicate that 100 mM NaCl treatment causes biochemical as well as physiochemical changes in all the five cultivars of *M. indica*. Under controlled conditions, (RWC) differed significantly among different genotypes. However, there was a gradual decrease in the relative water content with increased duration of salinity treatment in all the genotypes. After 7 days of treatment RWC decreased in all the genotypes and the lowest was recorded in K2 (Table 1). Salt stress resulted in increased cellular injury in all the varieties with increased duration of the treatment. Membrane stability is altered just after 3 days of treatment in K2 and S1 genotypes (Fig.1). For the genotypes S34, RFS175 and S13 cellular membrane remained stable up to

seven days and then there was an appreciable decrease in following days. Cultivar K2 showed the least cellular membrane stability, salt tolerant variety S34 showed 73 % stability whereas S13 and RFS175 showed 71 %.

Table I. RWC of *M. indica* genotypes under salinity stress (100 mM NaCl).

Tableau I. RWC des génotypes *M. indica* sous un stress salin (100 mM de NaCl).

Genotypes	Control	15 days
Génotypes	Témoin	15 jours
S34	80.5 ± 2.1	75.7 ± 3.4
S1	81.0 ± 2.8	70.0 ± 7.3
RFS 175	78.0 ± 2.8	68.3 ± 10.5
S13	78.5 ± 1.4	71.7 ± 9.7
K2	80.1 ± 1.4	68.4 ± 4.1

± indicates Standard Deviation. / ± indique l'écart type.

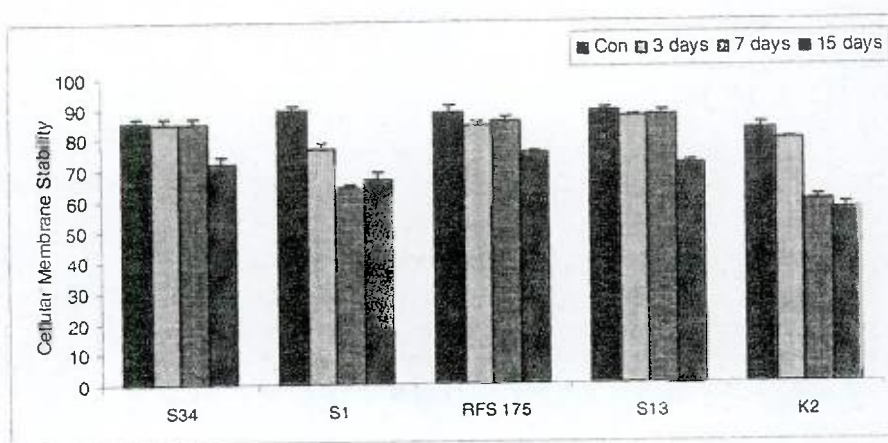


Fig. 1. Cellular membrane stability index in leaves of control and salt stressed mulberry cultivars. Values are means of three biological replicates. Vertical bars indicate ± S. D.

Fig. 1. Indice de stabilité de la membrane cellulaire chez les feuilles des cultivars de mûrier témoins et sous stress salin.

Les valeurs sont les moyennes de trois répétitions biologiques. Les barres verticales indiquent l'écart type.

Table II. Maximum photosynthetic efficiency (Fv/Fm) and quantum photosynthetic yield (ΦPSII) in *M. indica* genotypes under salinity stress.

Tableau II. Efficacité photosynthétique maximum (Fv/Fm) et part de rendement photosynthétique (ΦPSII) chez les génotypes *M. indica* sous stress salin.

Genotypes	Fv /Fm		Φ PSII	
	0 days	15 days	0 days	15 days
Génotypes	0 jour	15 jours	0 jour	15 jours
S34	0.93 ± 0.02	0.89 ± 0.04	0.711 ± 0.04	0.54 ± 0.046
S1	0.86 ± 0.020	0.78 ± 0.02	0.701 ± 0.08	0.34 ± 0.070
RFS 175	0.93 ± 0.017	0.87 ± 0.01	0.69 ± 0.02	0.49 ± 0.034
S13	0.9 ± 0.011	0.86 ± 0.01	0.727 ± 0.01	0.52 ± 0.050
K2	0.88 ± 0.03	0.75 ± 0.09	0.699 ± 0.06	0.32 ± 0.065

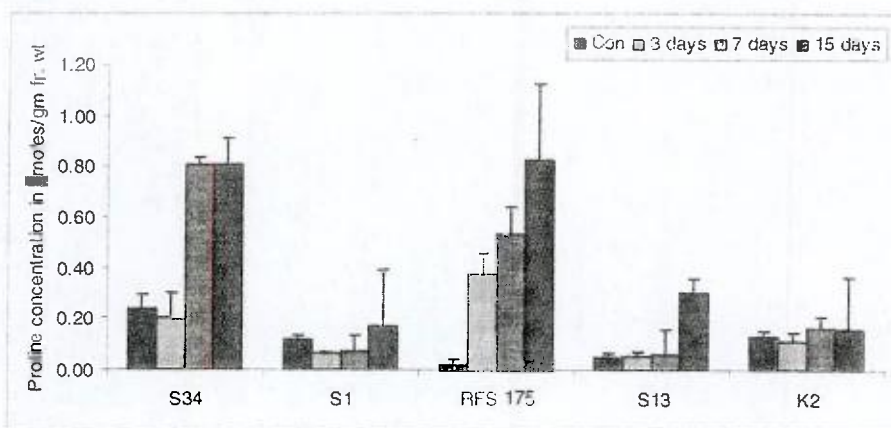


Fig. 2. Free proline accumulation in leaves of control and salt stressed mulberry cultivars.

Values are means of three biological replicates. Vertical bars indicate $\pm$ S. D. Observed significance level is < 0.001 .

Fig. 2. Accumulation de proline libre dans les feuilles des cultivars de mûrier témoins et sous stress salin.

Les valeurs sont les moyennes de trois répétitions biologiques. Les barres verticales indiquent l'écart type. Le niveau de signification observée est $< 0,001$.

Free proline content in the leaves of control and salt stressed plants was estimated on 3rd, 7th and 15th day and results are presented in the Fig.2. Genotypic differences in proline accumulation during salt stress have been observed in mulberry with increased basal proline level in S34. There was

significant variability in free proline content among the cultivars and its levels were elevated with increased severity and duration of stress. After 15 days, genotypes RFS175 and S34 exhibited a higher proline accumulation in comparison to S1, K2 and S13.

Table III. Salinity Susceptibility Index (SSI) and Cumulative Salinity Susceptibility Index (C-SSI) of *M. indica* genotypes under salinity stress (100 mM NaCl).

Tableau III. Indice de sensibilité à la salinité (SSI) et indice de sensibilité cumulatif à la salinité (C-SSI) de génotypes de *M. indica* sous un stress de salinité (100 mM de NaCl).

	F _v /F _m	ØPSII	RWC	CMS	NR	C-SSI
S34	0.043	0.900	0.060	0.159	0.319	1.480
S1	0.100	0.941	0.136	0.254	0.476	1.907
RFS 175	0.059	0.956	0.124	0.146	0.470	1.755
S13	0.044	0.849	0.087	0.197	0.795	1.972
K2	0.151	1.000	0.156	0.319	0.556	2.181

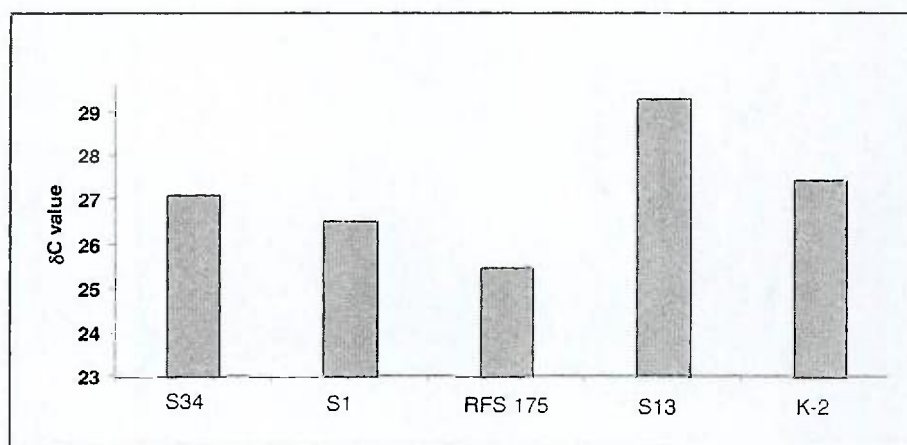


Fig. 3. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (ΔC) values in different *Morus indica* genotypes.

Fig. 3. Valeurs $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (ΔC) chez différents génotypes de *Morus indica*.

Table IV. Two way Analysis of Variance (ANOVA) table for biochemical parameters studied.

Tableau IV. Tableau de l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) pour les paramètres biochimiques étudiés.

Source of variation	Relative water Content		Proline		CMS (Cellular membrane stability)	
	D. F.	Mean Sum of Squares	D. F.	Mean Sum of Square	D. F.	Mean Sum of Squares
Source de variation	Teneur relative en eau		Proline		CMS (Stabilité de la membrane cellulaire)	
	D.L.	Somme des carrés moyens	D.L.	Somme des carrés moyens	D.L.	Somme des carrés moyens
Replication / Répétition	2	12.8	2	0.001	2	1.8
Lines / Lignées	5	339.4**	6	0.003**	6	183.7**
Hours / Heures	-	-	-	-	2	57.6**
Stresses	-	-	2	0.13**	-	-
Days / Jours	2	2554.5**	-	-	-	-
(Stresses / Days / hours) vs. varieties (Stress / Jours / heures) par rapport aux variétés	10	162.6**	12	0.0001**	12	181.2**
Error / Ecart	34	20.1	40	0	62	10.9

D. F. Degree of freedom (n-1) / Degrés de liberté (n-1).

NS: Values are non significant / Les valeurs ne sont pas significatives.

** values are significant at $P < 0.01$ / Les valeurs sont significatives au seuil de $P < 0.01$.

* values are significant at $P < 0.05$ / Les valeurs sont significatives au seuil de $P < 0.05$.

Photosynthetic efficiency is measured in terms of F_v/F_m which is a direct measure of PS II efficiency. As photosystem II appears to be particularly sensitive to a number of stress factors, chlorophyll fluorescence is used as a tool in revealing stress response mechanism. The antennae efficiency was found to be affected in all the genotypes since fall in F_o was observed. Maximum photosynthetic quantum efficiency of PSII however did not change significantly with salinity (Table II). While decrease in F_v/F_m is not so evident, the drop in the photochemical quantum efficiency was well defined (Table II). Two-way ANOVA analysis undertaken with various parameters also indicate the results to be significant (Table IV). The photosynthetic machinery in K2 and S1 genotypes were found to be more susceptible to salinity in comparison to other genotypes (Table III). Carbon isotope discrimination of different cultivars varied significantly ($P < 0.001$) under well watered condition. The ΔC has a range of 25.4 - 29.3. RFS 175 has the lowest value of ΔC , thus indicating the highest water use efficiency (Fig. 3) amongst the cultivars tested.

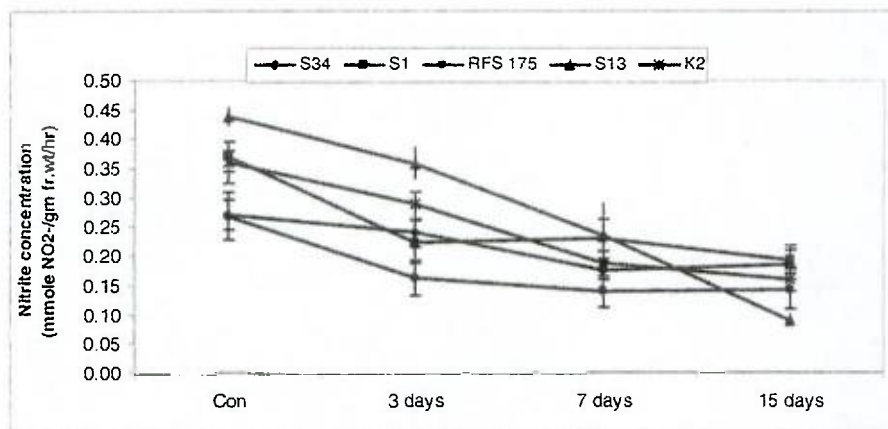


Fig. 4. Nitrate reductase activity in leaves of control and salt stressed mulberry cultivars.

Values are means of three biological replicates. Vertical bars indicate $\pm$ S. D.

Fig. 4. Activité nitrate réductase dans les feuilles des cultivars de mûrier témoins et sous stress salin.

Les valeurs sont les moyennes de trois répétitions biologiques. Les barres verticales indiquent l'écart type.

There exist some variation amongst the genotypes for nitrogen use efficiency and S13 shows maximum NR activity. Salinity has an inhibitory effect on the activity of nitrate reductase and accumulation of nitrite ions in all the cultivars (Fig.4). Following continuous exposure to salinity stress, there is an evident decrease in NR activity in the leaves in all the cultivars. Genotype S13 displays maximum decrease followed by K2 and S1. In S34, NR activity is the least affected by salinity as indicated by SSI for NR (see also Table III).

Cumulative Susceptibility Index (C-SSI) has been calculated for each genotype taking the values of SSI for NR, CMS, F_v/F_m , $\Phi PSII$ and RWC (Table III). C-SSI value gives an overall picture to distinguish between a tolerant and susceptible variety. Comparing the values of CSSI in all the genotypes, RFS175 and S34 show maximum tolerance while K2 appears to be the most susceptible (Table III).

DISCUSSION

To develop salt tolerant crops, it is necessary to identify the degree of salinity tolerance within the crops and their wild relatives. Investigations on genetically based differences between closely related plants are important because these studies provide necessary information to select traits for breeding salt tolerant crops (Tester and Davenport 2003). Recent studies have found significant differences among rice varieties (Lee *et al.*, 2003), barley cvs. (Gorham *et al.*, 1994), *Glycine* species (Kao *et al.*, 2006) and mulberry varieties (Mogili *et al.*, 2002). An attempt has been made to study the short and long term effects of salinity on growth of mulberry and thus to assess the tolerance potential in different cultivars of mulberry based on physiological marker like proline accumulation and other tolerance indices like cellular membrane stability and nitrogen assimilation.

Water status is highly sensitive to salinity and therefore is dominant in determining the plants response to stress (Yeo *et al.*, 1985). Analysis of relative water content revealed the common reaction to salinity. Gradual decrease in relative water content is observed which is a result of high salt concentration in external solution, which causes osmotic stress and dehydration at cellular level. There is substantial evidence that glycophytic as well as halophytic species adjust their response to high salt concentration by lowering their tissue osmotic potentials (Cachorro *et al.*, 1995).

Although accumulation of inorganic ions in the cell leads to lowering of osmotic potential, this could also lead to problems of ion compartmentalization and thus altering leaf cellular structure and function. Cell membranes are the first targets of many plant stresses and maintenance of their integrity is a major component of drought and salinity tolerance in plant (Bajji *et al.*, 2002). Measurement of cellular membrane stability has often been used for screening against drought tolerance in wheat (Blum and Ebrecon, 1981), maize (Premachandra *et al.*, 1989), *Populus* (Michael *et al.*, 1994) and mulberry (Ramachandra Reddy *et al.*, 2004) and for salinity in wheat (Farooq and Azam, 2006, Sairam, 2002). In the present study, we have used CMS index to assess salt tolerance amongst different mulberry cultivars. Our data for CMS (Fig. 1) and its SSI (Table III) indicate that S34, S13 and RFS175 are more tolerant for osmotic stress than K2 and S1.

In glycophytes, high level of injury may not occur if the plant can avoid toxic levels of NaCl reaching the leaves or make osmotic adjustments by accumulating higher levels of organic solutes such as proline (Hasegawa *et al.*, 2000), glycine betaine, soluble sugars and higher levels of K^+ in the cytoplasm. Proline is known to contribute to membrane stability (Hanson and Burnet, 1994, Ashraf and Harris, 2004), and to mitigate the effect of NaCl on cell membrane disruption (Mansour, 1998). Proline accumulation is one of the adaptations of plants to salinity and water deficit in mulberry (Kumar *et al.*, 2000, 2003; Ramanjulu and Sudhakar, 2000) and it has been widely advocated for use as a parameter for selection of salt stress tolerance in mulberry (Ramanjulu and Sudhakar, 2001) as well as in other crops (Misra and Gupta, 2005). Nonetheless, in accordance with earlier reports it has been observed that, at all the salinity levels, tested free proline content was significantly more elevated in the stressed plants than in control plants in all the cultivars (Fig. 2). Proline may act as a signalling/regulatory molecule able to activate multiple responses that are an integral component of the adaptation processes to abiotic stresses including salt stress (Maggiao *et al.*, 2002). RFS175 shows 33 fold enhancement in proline concentration while K2 shows only 1.2 fold. For S13 there is a steady increase in proline accumulation and after 15 days proline accumulation is 6 folds. Data also show that salt tolerant cultivars have high proline content and depict the least cellular injury under stress conditions thus inferring a role of proline in maintenance of membrane stability.

We observed a considerable decrease in the efficiency of PSII in the leaves of plants subjected to salt stress which is measured by F_v/F_m and $\Phi PSII$. The most sensitive parameter of fluorescence induction, however, was found to be $\Phi PSII$. The reduction in $\Phi PSII$ indicates that for NaCl treatment there was a fall in the photosynthetic energy conversion in PSII. The fall in F_v/F_m was not so great. As reported by others (Stepien and Klobus, 2005), there was no evident decrease in maximal quantum efficiency (F_v/F_m) but a significant drop in $\Phi PSII$ was visible. Plants differ in their capacity to regulate how much water is lost per unit of carbon gained by carboxylation process as well as by stomatal conductance. Such differences can be referred to as differences in intrinsic water use efficiency. Carbon isotope discrimination provides an indirect measure of the variation in water use efficiency to environmental variables such as water availability, humidity and salinity which can be further exploited to improve the yield of crop species. Studies have confirmed the existence of significant genetic variability in WUE and its association with $\delta^{13}C$ (Sheshshayee *et al.*, 1996). In mulberry we observed a significant genotypic variability for $\delta^{13}C$ values. It has already been reported that lower $\delta^{13}C$ values indicates a better mesophyll efficiency and better carbon assimilation (Sheshshayee *et al.*, 1996). Cultivar RFS175 exhibited the lowest value for $\delta^{13}C$ thus showing better water use

efficiency and carbon assimilation rate, while K2 and S13 show high $\delta^{13}\text{C}$ indicating low assimilation rate and water use efficiency.

Several studies have reported that NO_3^- uptake and NR activity is severely affected by osmotic shocks induced by NaCl in plants under salt stress (Sharma and Dubey, 2005, Silveira *et al.*, 2001). Loss of NR activity could be a part of the biochemical adaptations to stress conditions. Decline in leaf NR activity could be the result of the lower nitrate uptake, disruption of cell membrane integrity or competition of chloride ions with nitrate ions in salt treated plants. After one month of salinity stress, all the varieties show significantly lower NR activity with S13 showing maximum reduction followed by K2 and S1. SSI for these cultivars also indicates their susceptibility (Table III). Initial effects of salinity are similar to that of water stress, therefore S13 which is a drought tolerant cultivar, does not exhibit much change in NR activity after 3 days, however, after 15 days, when salt concentration probably reaches to toxic level, NR activity is reduced drastically.

Based on cumulative susceptibility index (C-SSI) for various cellular parameters (proline accumulation and $\delta^{13}\text{C}$ values), it can be argued that RFS175 and S34 are tolerant to salinity while K2 seems to be the most susceptible one. These genotypes show a higher tolerance to salinity which may be due to the reduced rate of salt uptake or better compartmentalization of salt in the cell vacuoles and thereby preventing accumulation in the cytoplasm of ions which inhibit enzyme activity, or which build up in the cell wall and dehydrate the cell wall (Flowers and Yeo, 1986). The sensitivity of cytosolic enzymes to salt is similar in both glycophytes and halophytes indicating that the maintenance of a high cytosolic K^+/Na^+ concentration is a key requirement for plant growth under high salinity conditions (Greenway and Munns, 1980). The most direct way to maintain low cytoplasmic Na^+ is to sequester it in vacuoles. Plants have an efficient mechanism to compartmentalize excess of Na^+ to maintain a non toxic cellular environment in both halophytes and glycophytes. The pumping of Na^+ into the vacuoles is catalyzed by vacuolar antiporter and its abundance and expression determines the plant response to salinity. Expression analysis of *M. indica* vacuolar sodium hydrogen antiporter (MiNHX1) in two contrasting genotype S34 and K2 revealed increased transcript abundance in S34 as compared to K2. MiNHX transcript level was increased upon addition of high concentration of NaCl, however, this induction was found to be much higher in the salt tolerant genotype S34 than K2 (Lal *et al.*, 2009).

It can be inferred from the obtained results that variability occurs among closely related species and among different varieties in response to salinity stress. In mulberry, on the basis of salinity susceptibility index (SSI) for individual cellular and physical measured parameters, it is difficult to categorise the genotypes into tolerant and susceptible ones. However, Cumulative salinity susceptibility (C-SSI) index separated the genotypes into 3 groups with S34 having the lowest C-SSI as the most tolerant, S1 and S13 being intermediate and K2 as the most susceptible. The variability among the genotypes may be attributed to a wide range of specialization at different levels of organization in plant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms. Vibha Gulyani for her help with critical reading of the manuscript, and the Department of Biotechnology, Govt. of India for financial support. Shalini Kumari acknowledges CSIR, India, for Senior Research Fellowship.

REFERENCES

- ASHRAF M., HARRIS P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.*, 166: 3-16.

- BAJII M., KINET J.M., LUTS S. 2002. The use of electrolyte leakage method for assessing the cell membrane stability as a water stress tolerance test in durumwheat. *Plant Growth Regul.*, 36: 61-70.
- BATES L.S., WALDREN R.P., TEARE I.D. 1973. Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
- Bloch D., Hoffmann C.M., Marlander B. 2006. Impact of water supply on photosynthesis, water use and carbon isotope discrimination of sugar beet genotypes. *Europ. J. Agronomy*, 24: 218-225.
- BLUM A., EBRECON A. 1981. Cell membrane stability as measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.*, 21: 43-47.
- CACHORRO P., OLMOS E., ORTIZ A., CERDA A. 1995. Salinity-induced changes in the structure and ultrastructure of bean root cells. *Biol Plant*, 37: 273-283.
- FAROOQ S., AZAM F. 2006. The use of cell membrane stability (CMS) technique to screen for salt tolerant wheat varieties. *J. Plant Physiol.*, 16: 629-637.
- FARQUHAR G.D., RICHARDS R.A. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.*, 11: 539-552.
- FARQUHAR G.D., EHLERINGER J.R., HUBICK K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 503-537.
- FOKER M., NYUGEN H.T., BLUM A. 1998. Heat tolerance in spring wheat. I. Estimating cellular thermotolerance and its heritability. *Euphytica*, 104: 1-8.
- FLOWER T.J., YEO A.R. 1986. Ion relations of plant under drought and salinity. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13: 75-91.
- GORHAM J., PAPA R., ALOY-LEONART M. 1994. Varietal differences in sodium uptake in barley cultivars exposed to soil salinity or salt spray. *J. Exp. Bot.*, 45: 895-901.
- GREENWAY H., MUNNS R. 1980. Mechanism of salt tolerance in non halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31: 149-190.
- HANSON A.D., BURNET M. 1994. Evolution and metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in higher plants. In (JH Cherry ed), "Cell Biology: Biochemical and Cellular Mechanism of Stress Tolerance in Plants". NATO ASI Series H Springer-Berlin, Pp 291-302.
- HASEGAWA P.M., BRESSAN R. A., ZHU J.K., BOHNERT H.J. 2000. Plant cellular and molecular response to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 463-499.
- KAO W.Y., TSAI T.T., TSAI H.C., SHIH C.N. 2006. Response of three *Glycine* species to salt stress. *Environ. Exp. Bot.*, 56: 120-125.
- KUMAR S.G., REDDY A.M., SUDHAKAR C. 2003. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Sci.*, 165: 1245-1251.
- KUMAR S.G., MADHUSUDAN K.V., SREENIVASULU N., SUDHAKAR C. 2000. Stress responses in two genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Indian J. Exp. Biol.*, 38: 192-195.
- LAL S., RAVI V., KHURANA J.P., KHURANA P. 2008. Repertoire of leaf expressed sequence tags (ESTs) and partial characterization of stress-related and membrane transporter genes from mulberry (*Morus indica* L.). *Tree Genetics and Genomics*, 5: 359-374.
- LEE K.S., CHOI W.Y., KO J.C., KIM T.S., GREGORIO G.B. 2003. Salinity tolerance of japonica and indica rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. *Planta*, 216: 1043-1046.
- MAXWELL K., JOHNSON G.N. 2000. Chlorophyll Fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, Vol 51: No.345, 659-668.
- MAGGAIO A., MIYAZAKI S., VERONESE P., FUJUITA T., IBEAS J.I., DAMSZ B., NARASIMMAN M.L., HASEGAWA P.M., JOLY R.J., Bressan R.A. 2002. Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction? *Plant J.*, 31: 699-712.
- MANSOUR M.M.F. 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycine betaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 36: 767-772.
- MICHAEL G.G., MICHAEL R.K., JAMES R.B. 1994. Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water stressed *Populus deltoids* clones. *Tree Physiol.*, 14: 75-587.

- MISRA N., GUPTA A.K. 2005. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Sci.*, 169: 331-339.
- MOGILI T., SARKAR A., REDDY M.M. 2002. Effect of salinity stress on some improved varieties of mulberry, *Morus* spp. *Sericologia*, 42(2): 144-163.
- MONNEVEUX P., REKIKI D., ACEVEDO E., MERAH O. 2006. Effect of drought on leaf gas exchange, carbon isotope discrimination, transpiration efficiency and productivity in field grown durum wheat genotypes. *Plant Sci.*, 170: 867-872.
- MUNNS R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, 25: 239-250.
- PREMCHANDRA G.S., SANEOKA H., OGTA S. 1989. Nutrio-physiological evaluation of the polyethylene glycol test of cell membrane stability in maize. *Crop Sci.*, 29: 1292-1297.
- RAMANJULU S., SUDHAKAR C. 2000. Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *J. Plant Physiol.*, 157: 81-85.
- RAMANJULU S., SUDHAKAR C. 2001. Allevation of NaCl salinity stress by calcium is partly related to the increase in proline accumulation in mulberry (*Morus alba* L.) callus. *J Plant Biol.*, 28: 203-206.
- RAMACHANDRA REDDY A., CHAITANYA K.V., JUTUR P.P., SUMITHRA K. 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environ. Exp. Bot.*, 52: 33-42.
- SAIRAM R.K., RAO K.V., SRIVASTAV G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.*, 163 :1037-1046.
- SAIRAM R.K., TYAGI A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.*, 86: 407-421.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SARANGA Y., FLASH I., PATERSON A.H., YAKIR D. 1999. Carbon isotope ratio in cotton with growth stage and plant organ. *Plant Sci.*, 142: 47-56.
- SHARMA P., DUBEY R.S. 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J. Plant Physiol.*, 162: 854-864.
- SILVEIRA J.A.G., MELO A.R.B., VIEGAS R.A., OLIVEIRA J.T.A. 2001. Salinity induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Environ. Exp. Bot.*, 46: 171-179.
- SHESHSHAYEE M.S., KRISHNAPRASAD B.T., NATRAJ K.N., PRASAD T.G., SHANKAR A.G., UDAYKUMAR M. 1996. Rate of intercellular CO₂ concentration to stomatal conductance is a reflection of mesophyll efficiency. *Curr. Sci.*, 70: 672-675.
- STAPIEN P., KLOBUS G. 2006. Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biol. Plant.*, 50: 610-661.
- TABAEI-AGHDAEI S., HARRISON P., PEAREE, R.S. 2000. Expression of dehydration stress related genes in crown of wheat grass having contrasting acclimation to salt, cold and drought. *Plant Cell Environ.*, 23: 561-571.
- TESTER M., DAVENPORT R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.*, 91: 503-527.
- UDAYKUMAR M., SHESHSHAYEE M.S., NATRAJ K.N., BINDUMADHAV A.H., DEVENDRA R., AFTABHUSAIN I.S., PRASAD T.G. 1998. Why has breeding for water use efficiency has not been successful? An analysis and alternate approach to exploit this trait for crop improvement. *Curr. Sci.*, 74: 994-1000.
- YEO A.R., CAPRON S.J.M., FLOWERS T.J. 1985. The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): Gas exchange by individual leaves relation to their salt content. *J. Exp. Bot.*, 36: 1240-1248.

EVALUATION DIFFERENTIELLE DE LA TOLERANCE A LA SALINITE CHEZ DES GENOTYPES DE MURIER INDIENS DE *MORUS INDICA* A RENDEMENT ELEVE

SHALINI LAL & PARAMJIT KHURANA

Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi South Campus, Dhaula Kuan, New Delhi – 110 021, Inde. Email : param@genomeindia.org

*La tolérance au sel est un caractère complexe qui implique la coordination de réponses cellulaires, osmotiques et ioniques au niveau de l'ensemble de la plante. Les plantes exposées au stress du sel subissent des changements en réponse à leur environnement, ce qui provoque la sénescence prématurée et la diminution de la surface photosynthétique. Il est donc préférable d'étudier la diversité génotypique nécessaire pour le lignage d'une résistance accrue à la salinité dans des conditions d'exposition à la salinité à long terme. Dans ce travail, on a étudié l'effet de la simulation du stress salin sur la croissance de certains cultivars populaires de *Morus indica* (sous stress à la salinité) et on l'a comparé à celle du génotype tolérant au sel S34. Les paramètres pris en considération sont l'accumulation de proline libre, le rendement photosynthétique, l'activité nitrate réductase (NR), la stabilité de la membrane cellulaire (CMS), la teneur relative en eau (RWC) et la discrimination des isotopes du carbone. Dans des conditions de simulation de stress, l'indice de sensibilité à la salinité (C-SSI) pour chaque génotype suggère que RFS 175 et S34 tolèrent la salinité et que K2 semble être le cultivar le plus sensible au sel. La tolérance à une salinité élevée du sol implique différents processus et se manifeste par une gamme variée de spécialisations à différents niveaux d'organisation, tels que la morphologie, le transport membranaire, la biochimie cellulaire et la transcription des gènes.*

INTRODUCTION

Le mûrier est l'alimentation de base des vers à soie et il est la colonne vertébrale de toute l'industrie de la soie dans le monde entier. Les plantes perçoivent le stress osmotique, ce qui entraîne la diminution de la croissance, suivi par un rétablissement progressif vers un nouveau taux de croissance réduit (Munns, 2002). Les plantes montrent donc deux phases de réponse à la salinité en matière de croissance. Tandis que pour la première phase de diminution de la croissance il y a, de manière surprenante, peu de variation génotypique, la croissance pendant la deuxième phase diminue en raison d'un dommage cytoplasmique interne provoqué par l'accumulation des ions. La capacité inhérente à exclure les ions du cytoplasme est donc la clé de la survie dans des conditions de salinité à long terme. En fait, on a généralement observé que les variétés qui tolèrent le sel développent des mécanismes efficaces pour compartimentaliser les ions avant qu'ils ne deviennent toxiques pour la plante. La tolérance à la sécheresse et à la salinité est un caractère important à associer avec d'autres caractères souhaitables, comme la qualité de la feuille dans les zones tropicales et semi-arides où on cultive le mûrier. Il serait donc très souhaitable d'évaluer les germoplasmes de mûrier en matière de stress au sel et à la sécheresse.

La proline est l'un des repères bien connus du stress et on constate que ses niveaux augmentent sous un stress osmotique. Elle pourrait agir comme un réservoir organique d'azote, qui peut être utilisé lors de la récupération par rapport au stress (Sairam et Tyagi, 2004). Un autre acteur clé de l'assimilation de l'azote est la nitrate réductase et l'activité de ses enzymes qui peut être utilisée avec l'efficacité photosynthétique comme de bons indicateurs cellulaires du stress à la salinité. Le stress à

la salinité, non seulement transmet la toxicité Na^+ à la plante, mais il a aussi un effet secondaire comme l'insuffisance / l'épuisement de l'eau (Munss, 2002), que l'on a considéré comme l'une des conséquences les plus courantes et les plus graves de la salinité (Tabaei – Aghadaei et coll., 2000), ce qui entraîne le mauvais fonctionnement des membranes cellulaires, en augmentant leur perméabilité aux ions et aux électrolytes. L'estimation du dysfonctionnement de la membrane en mesurant la perte / la fuite des électrolytes cellulaires en cas de stress des tissus foliaires affectés, est de plus en plus utilisée comme mesure de Stabilité de la Membrane Cellulaire (CMS) et comme évaluation de la résistance au stress. Dans cet article, afin de mieux comprendre les aspects de la tolérance au sel chez le mûrier, nous rapportons une analyse comparative du potentiel de tolérance au sel chez différents cultivars de mûrier, d'après l'accumulation d'osmolytes, la stabilité de la membrane, l'assimilation de l'azote et l'efficacité photosynthétique.

De plus, on a proposé le ratio des isotopes de carbone $\delta^{13}\text{C}$ comme un critère de sélection indirect de l'efficacité d'utilisation de l'eau. On définit l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) comme le ratio entre la matière sèche produite par rapport à la photosynthèse totale pendant une période de croissance spécifique. Les plantes font une discrimination contre le ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) pendant la photosynthèse et le degré de discrimination présente une forte relation inversée avec la WUE chez de nombreuses cultures en champ, comme le blé (Farquhar et Richards, 1984 ; Monneveux et coll., 2006), la dolique (Udaykumar et coll., 1998), le coton (Saranga et coll., 1999) et *Beta vulgaris* (Bloch et coll., 2006). Le principal objectif de cette étude est de déterminer s'il existe une variation entre les cultivars de mûrier dans leur réponse à la tolérance à la salinité et dans leur efficacité d'utilisation de l'eau en évaluant le $\delta^{13}\text{C}$.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériels végétaux et traitements de stress :

Dans cette étude, on a essayé d'étudier l'effet de la salinité sur les plants en pot de cultivars variés de *Morus indica*. On réalise des boutures de plants de cinq à sept ans de longueur et de diamètre égaux avec approximativement 3 à 4 bourgeons avec les var. K2, S1, S34, S13 et RFS175 de *M. indica* dans des pots en terre de 20 à 25 cm de diamètre. On arrose les pots quotidiennement et on les maintient dans des conditions naturelles sur le terrain départemental du Campus sud, (Université de Delhi). Au bout de 3 mois, quand les plants se sont établis avec succès en pot comme le montre la nouvelle structure de croissance, on procède au traitement de salinité. On soumet les plants à deux conditions, témoin (T0) et un traitement de salinité (T1) où $\text{T1} = 100 \text{ mM NaCl}$ pendant 15 jours un jour sur deux. Après une période déterminée, on prend les 3^{ème} et 4^{ème} feuilles et on analyse la stabilité de la membrane, les teneurs en proline et en chlorophylle, le rendement photosynthétique, la teneur relative en eau et l'activité nitratre réductase.

2. Teneur relative en eau (RWC) :

Pour la détermination de la RWC, on détache les feuilles fraîches des plants de chaque traitement et génotype et on les pèse immédiatement pour enregistrer le poids frais (FW) puis on les trempe dans de l'eau distillée pendant 12 h. On sèche les feuilles pour enlever l'excès d'eau, on les pèse pour enregistrer le poids des feuilles turgescents (TW) et on les sèche au four à 70°C pendant 24 h pour enregistrer le poids sec (DW). On détermine la RWC avec l'équation $[\text{FW} - \text{DW}] \times 100 / [\text{TW} - \text{DW}]$.

3. Indice de Stabilité de la Membrane Cellulaire (CMS) :

On détermine la CMS selon la méthode de Foker et coll., (1998). Dans ce but, on sélectionne une jeune feuille complètement déployée et on la coupe en morceaux que l'on plonge dans de l'eau distillée dans des tubes à essai. On conserve les tubes à 30°C pendant 30 min. et on mesure la conductivité (C1). Puis on passe les échantillons de feuille à l'autoclave pendant 15 min. et on mesure

à nouveau la conductivité électrique (C2) dans le surnageant. On détermine la CMS en utilisant l'équation $\{1 - (C1 / C2)\}$.

4. Estimation de la proline :

On détermine la concentration en proline de manière spectrophotométrique selon Bates et coll., (1973). On homogénéise des feuilles fraîches (500 mg) dans 10 ml d'acide sulphasalicylique à 3 %. On enregistre la densité optique de l'extrait à 520 nm.

5. Activité nitrate réductase :

On incube les feuilles pleinement déployées dans un tampon d'évaluation de 5 ml contenant du n-propanol à 5 %, 0,1 M de tampon de phosphate de potassium et 0,2 M KNO₃ à 30° C pendant 60 min dans des conditions anaérobiques à l'obscurité (Silveira et coll., 2001). On stoppe la réaction en immergeant les tubes dans de l'eau bouillante. Pour analyser la formation de nitrite, on ajoute 1 ml de sulphanilamide (1 % dans 1 N HCl) et 1 ml de solution aqueuse de N-1-naphthyl-éthylènediamine à 0,02 % à 0,5 ml de mélange de réaction. Au bout de 20 min, on ajoute 2,5 ml d'eau et on enregistre la capacité d'absorption à 540 nm.

6. Mesure du rendement photosynthétique :

On mesure la fluorescence de la chlorophylle à température ambiante avec un fluoromètre portable (PAM-210, Walz, Allemagne). On estime le niveau de fluorescence minimal (F₀) avec tous les centres de réaction PSII ouverts en mesurant la lumière modulée, qui est suffisamment basse. On détermine le niveau de fluorescence maximum (F_m) avec tous les centres de réaction PSII fermés avec une impulsion de saturation de 0,8 s à 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez des feuilles adaptées à l'obscurité. On mesure le rendement photosynthétique en tant que FV / F_m où Fv = F_m - F₀. Puis, on illumine les feuilles avec une lumière actinique de 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Quand la feuille atteint une photosynthèse régulière, on enregistre l'état régulier de la fluorescence (F_r) et on donne une 2^{ème} impulsion de saturation de 0,8 s à 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour déterminer la fluorescence maximale (F_{m'}) dans la condition de lumière adaptée. Ensuite, on éteint la lumière actinique, on détermine la fluorescence minimale (F_{m'}) de la lumière adaptée (F_{0'}) par l'illumination avec une lumière rouge lointaine. On mesure le niveau d'efficacité intrinsèque en tant que $\Phi\text{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$ (Maxwell et Johnson, 2000).

7. Mesure de la discrimination des isotopes du carbone :

On sèche les feuilles de chaque génotype au four et on les réduit en poudre fine. On procède à l'analyse de ¹³C / ¹²C par la spectrométrie de masse de ratio des isotopes (IRMS) aux Installations Nationales pour les Etudes d'Isotopes Stables en Sciences Biologiques, UAS, Bangalore. On calcule la composition en isotopes du carbone comme suit $[(R \text{ échantillon} / R \text{ étalon}) - 1] \times 1000$, où R est le ¹³C / ¹²C et on exprime le rapport en tant que $\delta^{13}\text{C}$ (‰) (Farquhar et coll., 1989).

8. Indice de sensibilité à la salinité (SSI) :

On calcule l'indice de sensibilité à la salinité (SSI) pour chaque génotype comme suit :

$\text{SSI} (\%) = 1 - (XT / XC) \times 100$, où XT est la valeur moyenne (calculée pour trois échantillons) des paramètres mesurés dans des conditions de salinité et XC est la valeur moyenne des paramètres mesurés dans des conditions témoins.

9. Analyse statistique :

On évalue l'effet de la salinité et la différence entre les différents génotypes en utilisant une ANOVA (analyse de variance) à deux facteurs. On analyse chaque paramètre individuellement. On calcule les moyennes pour les trois plants et on les utilise comme valeurs pour les données dans les analyses.

RESULTATS

Cette étude révèle que la sensibilité au sel diffère entre les cinq cultivars de mûrier et qu'il existe une différence des réponses moléculaires au stress à la salinité, qui peut être due à la variabilité génétique entre les variétés. Les résultats de cette étude indiquent que le traitement à 100 mM de NaCl entraîne des changements biochimiques et physiochimiques chez les cinq cultivars de *M. indica*. Dans des conditions contrôlées, la RWC diffère de manière significative entre les différents génotypes. Cependant, il y a une baisse progressive de la teneur relative en eau avec l'augmentation de la durée du traitement de salinité chez tous les génotypes. Au bout de 7 jours de traitement, la RWC baisse chez tous les génotypes et on enregistre la RWC la plus faible chez K2 (Tableau I). Le stress du sel entraîne une augmentation des blessures cellulaires chez tous les génotypes avec l'augmentation de la durée du traitement. La stabilité de la membrane est altérée après juste trois jours de traitement chez les génotypes K2 et S1 (Fig. 1). Pour les génotypes S34, RFS175 et S13, la membrane cellulaire reste stable jusqu'à sept jours, puis il y a une baisse appréciable les jours suivants. Le cultivar K2 présente la stabilité de la membrane cellulaire la moins importante, la variété tolérante au sel S34 présente 73 % de stabilité, tandis que S13 et RFS175 présentent 71 %. On estime la teneur en proline libre dans les feuilles du témoin et chez les plants sous stress salin le 3^{ème}, le 7^{ème} et le 15^{ème} jour et les résultats sont présentés dans la Fig. 2. On a observé des différences génotypiques pour l'accumulation de proline dans les conditions de stress salin chez le mûrier, avec l'augmentation du niveau de base en proline chez S34. Il y a une variabilité significative de la teneur en proline libre parmi les cultivars et ses niveaux sont élevés avec l'augmentation de la sévérité et de la durée du stress. Au bout de 15 jours, les génotypes RFS175 et S34 présentent une accumulation plus importante de proline par comparaison à S1, K2 et S13.

On mesure l'efficacité photosynthétique en termes de F_v / F_m , qui est une mesure directe de l'efficacité de PSII. Comme le photosystème II semble être particulièrement sensible à un certain nombre de facteurs de stress, on utilise la fluorescence de la chlorophylle comme outil pour révéler le mécanisme de réponse au stress. On constate que l'efficacité est affectée chez tous les génotypes puisqu'on observe la baisse de F_o . Cependant, l'efficacité de la quantité photosynthétique maximum de PSII ne change pas de manière significative avec la salinité (Tableau II). Alors que la baisse de F_v / F_m n'est pas si évidente, la baisse de l'efficacité de la quantité photosynthétique est bien définie (Tableau II). L'analyse ANOVA à deux facteurs entreprise avec plusieurs paramètres indique aussi que les résultats sont significatifs (Tableau IV). Le mécanisme photosynthétique chez les génotypes K2 et S1 s'avère plus sensible à la salinité par comparaison aux autres génotypes (Tableau III). La discrimination des isotopes du carbone des différents cultivars varie de manière significative ($P < 0,001$) dans des conditions de bonne irrigation. La ΔC est comprise entre 25,4 et 29,3. RFS175 a la valeur la plus faible de ΔC , ce qui indique donc l'efficacité la plus importante d'utilisation de l'eau (Fig. 3) parmi les cultivars testés.

Il existe une certaine variation entre les génotypes concernant l'efficacité d'utilisation de l'azote et S13 présente l'activité NR maximum. La salinité a un effet inhibiteur sur l'activité nitratre réductase et sur l'accumulation des ions de nitrite chez tous les cultivars (Fig. 4). A la suite d'une exposition continue au stress salin, il y a une baisse évidente de l'activité NR dans les feuilles de tous les cultivars. Le génotype S13 présente la baisse maximum suivi par K2 et S1. Chez S34, l'activité NR est la moins touchée par la salinité, comme l'indique le SSI pour NR (voir aussi Tableau III).

On calcule l'Indice de Sensibilité Cumulative (C-SSI) pour chaque génotype, en prenant les valeurs du SSI pour NR, CMS, F_v / F_m , Φ PSII et RWC (Tableau III). La valeur C-SSI donne une image générale pour distinguer une variété tolérante d'une variété sensible. La comparaison des valeurs de la C-SSI chez tous les génotypes montre que RFS175 et S34 présentent une tolérance maximum tandis que K2 semble être le plus sensible (Tableau III).

DISCUSSION

Pour mettre au point des cultures tolérant le sel, il est nécessaire d'identifier le degré de tolérance à la salinité chez les cultures et leurs parents sauvages. Les études sur les différences génétiques entre les plantes étroitement associées sont importantes parce que ces études apportent des informations nécessaires pour sélectionner les caractères pour le lignage de cultures tolérant le sel (Tester et Davenport, 2003). Les études récentes ont montré des différences significatives entre les variétés de riz (Lee et coll., 2003), les cultivars d'orge (Gorham et coll., 1994), les espèces de *Glycine* (Kao et coll., 2006) et les variétés de mûrier (Mogili et coll., 2002). On a essayé d'étudier les effets à court et à long terme de la salinité sur la croissance du mûrier et donc d'évaluer le potentiel de tolérance de différents cultivars de mûrier d'après un marqueur physiologique comme l'accumulation de proline et d'autres indices de tolérance comme la stabilité de la membrane cellulaire et l'assimilation de l'azote.

La teneur en eau est très sensible à la salinité et est donc un critère majeur pour déterminer la réponse des plantes au stress (Yeo et coll., 1985). L'analyse de la teneur relative en eau révèle la réaction courante à la salinité. On observe la baisse progressive de la teneur relative en eau, qui est le résultat d'une concentration élevée en sel dans la solution externe, qui provoque un stress osmotique et la déshydratation au niveau cellulaire. Il existe beaucoup de preuves selon lesquelles les espèces glycophytiques et halophytiques ajustent leur réponse à une concentration élevée en sel diminuant les potentiels osmotiques de leurs tissus (Cachorro et coll., 1995).

Bien que l'accumulation d'ions inorganiques dans les cellules entraîne la baisse du potentiel osmotique, cela pourrait entraîner des problèmes de compartimentalisation des ions et donc altérer la structure et la fonction cellulaires de la feuille. Les membranes cellulaires sont les premières cibles de nombreux stress chez les plantes et le maintien de leur intégrité est partie intégrante de la tolérance à la sécheresse et à la salinité chez la plante (Bajji et coll., 2002). On a souvent utilisé la mesure de la stabilité de la membrane cellulaire pour évaluer la tolérance à la sécheresse chez le blé (Blum et Ebrecon, 1981), le maïs (Premachandra et coll., 1989), *Populus* (Michael et coll., 1994) et le mûrier (Ramachandra Reddy et coll., 2004) et à la salinité chez le blé (Farooq et Azam, 2006, Sairam, 2002). Dans cette étude, nous avons utilisé l'indice CMS pour évaluer la tolérance au sel parmi différents cultivars de mûrier. Nos données pour la CMS (Fig. 1) et son SSI (Tableau III) indiquent que S34, S13 et RFS175 sont plus tolérants au stress osmotique que K2 et S1.

Chez les glycophytes, il pourrait ne pas se produire un niveau élevé de blessure si la plante peut éviter les niveaux toxiques de NaCl qui touchent les feuilles ou faire les ajustements osmotiques en accumulant des niveaux plus élevés de solutés organiques, tels que la proline (Hasegawa et coll., 2000), la bétaine glycine, les sucres solubles et des niveaux plus élevés de K^+ dans le cytoplasme. On sait que la proline contribue à la stabilité de la membrane (Hanson et Burnet, 1994, Ashraf et Harris, 2004) et à atténuer l'effet du NaCl sur le dérangement de la membrane cellulaire (Mansour, 1998). L'accumulation de la proline est l'une des adaptations des plantes à la salinité et au manque d'eau chez le mûrier (Kumar et coll., 2000 ; 2003 ; Ramanjulu et Sudhakar, 2000) et on l'a largement recommandé pour l'utilisation comme paramètre de sélection pour la tolérance au stress salin chez le mûrier (Ramanjulu et Sudhakar, 2001) ainsi que chez d'autres cultures (Misra et Gupta, 2005). Néanmoins, en accord avec des rapports antérieurs, on a observé qu'à tous les niveaux de salinité, la teneur testée en proline libre est significativement plus élevée chez les plants stressés que chez les plants témoins chez tous les cultivars (Fig. 2). La proline pourrait agir comme une molécule de signal / de régulation capable d'activer des réponses multiples qui sont partie intégrante des processus d'adaptation aux stress abiotiques y compris au stress salin (Maggaio et coll., 2002). RFS175 présente une amélioration multipliée par 33 de la concentration en proline tandis que pour K2 elle n'est multipliée que par 1.2. Pour S13, il y a une augmentation régulière de l'accumulation en proline et au bout de 15 jours l'accumulation en proline est multipliée par 6. Les données montrent aussi que les cultivars tolérant le sel ont une teneur élevée en proline et présentent le moins de blessures

cellulaires dans des conditions de stress, ce qui sous-entend que la proline joue un rôle dans le maintien de la stabilité de la membrane.

Nous avons observé une baisse considérable de l'efficacité de PSII dans les feuilles des plantes soumises au stress salin, que l'on mesure par F_v / F_m et Φ_{PSII} . Cependant, on constate que le paramètre le plus sensible d'induction de la fluorescence est Φ_{PSII} . La diminution de Φ_{PSII} indique que pour le traitement NaCl, il y a une baisse de la conversion de l'énergie photosynthétique chez PSII. La baisse de F_v / F_m n'est pas si importante. Comme d'autres l'ont signalé (Stepien et Klobus, 2005), il n'y a pas de baisse évidente de la part d'efficacité maximale (F_v / F_m), mais on voit une baisse visible de Φ_{PSII} . Les plantes diffèrent dans leur capacité à réguler la quantité d'eau perdue par unité de carbone gagnée par le processus de carboxylation ainsi que par la conductance stomatique. On peut se référer à ces différences comme à des différences d'efficacité intrinsèques de l'utilisation de l'eau. La discrimination des isotopes du carbone apporte une mesure indirecte de la variation de l'efficacité d'utilisation de l'eau par rapport à des variables environnementales, telles que la disponibilité en eau, l'humidité, la salinité, que l'on peut d'avantage exploiter pour améliorer le rendement des récoltes. Les études ont confirmé l'existence d'une variabilité génétique importante de la WUE et de son association avec $\delta^{13}C$ (Sheshshayee et coll., 1996). Chez le mûrier, on a observé une variabilité génotypique significative pour les valeurs $\delta^{13}C$. On a déjà rapporté que les valeurs $\delta^{13}C$ inférieures indiquent une meilleure efficacité du mésophylle et une meilleure assimilation du carbone (Sheshshayee et coll., 1996). Le cultivar RFS175 présente la valeur la plus faible pour $\delta^{13}C$, ce qui montre donc les meilleurs efficacité d'utilisation de l'eau et taux d'assimilation du carbone, tandis que K2 et S13 présentent une valeur $\delta^{13}C$ élevée, ce qui indique un taux d'assimilation et d'efficacité d'utilisation de l'eau faibles.

Plusieurs études ont rapporté que l'absorption de NO_3^- et l'activité NR sont très affectées par les chocs osmotiques induits par le NaCl chez les plantes dans des conditions de stress salin (Sharma et Dubey, 2005, Silveira et coll., 2001). La perte de l'activité NR pourrait être une partie des adaptations biochimiques aux conditions de stress. La baisse de l'activité NR de la feuille pourrait être le résultat d'une absorption moins importante de nitrate, du dérangement de l'intégrité de la membrane cellulaire ou de la concurrence des ions chlorure avec les ions nitrate chez les plantes traitées au sel. Après un mois sous stress salin, toutes les variétés présentent une activité NR significativement plus faible, avec S13 qui présente la diminution maximum, suivie par K2 et S1. La SSI pour ces cultivars indique aussi leur sensibilité (Tableau III). Les effets initiaux de la salinité sont semblables à ceux du stress hydrique donc, S13, qui est un cultivar tolérant la sécheresse ne présente pas beaucoup de changement de l'activité NR au bout de 3 jours, cependant, au bout de 15 jours quand la concentration en sel atteint probablement un niveau toxique, l'activité NR diminue de manière radicale.

D'après l'indice de sensibilité cumulative (C-SSI), pour divers paramètres cellulaires (accumulation de proline et valeurs $\delta^{13}C$), on peut estimer que RFS175 et S34 sont tolérants à la salinité, tandis que K2 semble être le plus sensible. Ces génotypes présentent une tolérance plus élevée à la salinité, ce qui pourrait être dû à la diminution du taux d'absorption du sel ou à la meilleure compartimentalisation du sel dans les vacuoles de la cellule, ce qui empêche donc l'accumulation des ions dans le cytoplasme, qui inhibent l'activité des enzymes, ou qui s'accumulent dans la paroi cellulaire et déshydratent la paroi cellulaire (Flowers et Yeo, 1986). La sensibilité des enzymes cytosoliques au sel est similaire à la fois chez les glycophytes et chez les halophytes, ce qui indique que le maintien d'un rapport cytosolique K^+ / Na^+ élevé est un facteur clé pour la croissance de la plante dans des conditions de salinité élevée (Greenways et Munns, 1980). La façon la plus directe de maintenir un Na^+ cytoplasmique faible est de l'isoler dans les vacuoles. Les plantes ont un mécanisme efficace pour compartimentaliser l'excès de Na^+ pour maintenir un environnement cellulaire non toxique à la fois chez les halophytes et chez les glycophytes. Le pompage du Na^+ dans les vacuoles est catalysé par l'antiporteur vacuolaire et son abondance et son expression déterminent la réponse de la plante à la salinité. L'analyse de l'expression de l'antiport de l'hydrogène de sodium

vacuolaire de *M. indica* (MiNHX1) chez deux génotypes opposés S34 et K2 révèle l'augmentation de l'abondance de transcript chez S34 par comparaison à K2. Le niveau de transcript MiNHX augmente lors de l'ajout d'une concentration élevée de NaCl, cependant on constate que cette induction est beaucoup plus élevée chez le génotype tolérant le sel S34 que chez K2 (Lal et coll., 2009).

D'après les résultats obtenus, on peut estimer qu'il existe une variabilité entre des espèces étroitement associées et entre différentes variétés en réponse au stress à la salinité. Chez le mûrier, il est difficile de classer les génotypes dans les catégories tolérantes et sensibles, sur la base de l'indice de sensibilité à la salinité (SSI), pour des paramètres cellulaires individuels et mesurés physiquement. Cependant, l'indice de sensibilité cumulative à la salinité (C-SSI) sépare les génotypes en 3 groupes, S34 ayant le C-SSI le plus faible et étant le plus tolérant, S1 et S13 étant intermédiaires et K2 étant le plus sensible. La variabilité entre les génotypes pourrait être attribuée à une gamme importante de spécialisations à différents niveaux d'organisation dans la plante.

INFLUENCE OF CYANOBACTERIAL BIOFERTILIZER ON SOIL NUTRIENTS AND MULBERRY LEAF QUALITY AND ITS IMPACT ON SILKWORM REARING

D. M. RAM RAO, DASAPPA & T. SELVA KUMAR¹

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

¹Silkworm Seed Production Center, NSSO, K.R. Nagar, Karnataka, India.

A field experiment was conducted to study the effect of cyanobacterial biofertilizer (CBB) along with and without chemical (NPK) fertilizer on soil nutrients and leaf quality traits of mulberry. Eleven CBB treated mulberry plots (T1 to T11) and one control plot (T12) were maintained and data on soil pH, soil nutrients and leaf quality traits were recorded in each of these experimental plots for every crop. The soil nutrients were increased whereas, the soil pH was decreased in different CBB treated plots as compared to control plot. Among different CBB treatments, T9 (Av + Nm + Sm (120kg/ha/crop) + 50% NPK) exhibited superior performance with regard to leaf quality traits and was found on par with control T12 (100% NPK). Bioassay study also revealed no significant difference in silkworm growth and cocoon characters between treatments T9 and T12. Overall results showed that T9 was very effective in terms of improvement in soil nutrients and leaf quality traits in mulberry. Further, it is also clear from the study that 50% reduction in the dose of chemical fertilizer can be compensated by the addition of higher dose of CBB. Therefore, CBB can be recommended to the sericulture farmers with an intension to improve the soil fertility condition and leaf quality traits besides saving 50% cost of chemical fertilizers.

Keywords: Cyanobacteria, mulberry leaf quality, leaf yield, soil nutrients and cocoon characters

INTRODUCTION

Cyanobacteria are a diverse group of prokaryotes, widely distributed in fresh water, marine and terrestrial environments. They are free living photosynthetic bacteria which exist singly or in colonies and some of them are in filament forms (Curtis, 1992; Jacobson *et al.*, 1993). The most common filament forms of cyanobacteria are *Anabaena* and *Nostoc* species as these cyanobacteria possess normal vegetative cells and specialized heterocyst cells which are involved in photosynthesis and nitrogen fixation respectively (Meckerras *et al.*, 1990; Jacobson *et al.*, 1993; Ehira *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Cyanobacteria are capable of forming symbiotic association with many plants and fungi (Perter, 1990; Bergman *et al.*, 1992; Meeks and Elahi, 2002). In association with plants, cyanobacteria fix atmospheric nitrogen and release organic matter, which is absorbed by plants (Gantar *et al.*, 1995; Rai *et al.*, 2000). Cyanobacteria were also used as biofertilizers in several crop plants (Venkataraman, 1986; Subba Rao, 1988; Gangawar and Thangavelu, 1992; Bose and Majumdar, 1999; Dasappa, 2000).

For the last two decades, biofertilizers like *Azotobacter*, *Azospirillum*, Vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) and Cyanobacteria etc., were used extensively to minimize the frequent use of chemical fertilizers, to improve the soil status and plant growth (Venkataraman, 1986; Subba Rao, 1988; Gangawar and Thangavelu, 1992; Das *et al.*, 1995; Bose and Majumdar, 1999). These biofertilizers were reported to be ecofriendly, economical and beneficial in mulberry (Das *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2000 and Dasappa, 2000). However, very few reports are available exclusively on the

use of cyanobacteria as biofertilizers for mulberry (Bose and Majumdar, 1999 and Dasappa 2000). Also the earlier scientists have not emphasized much on the influence of CBB on soil nutrients and leaf quality traits of mulberry. Therefore, the present investigation was carried out to assess the efficiency of cyanobacterial biofertilizers along with or without chemical fertilizer on soil status, leaf yield and leaf quality traits of mulberry and their influence on silkworm rearing parameters under tropical conditions of Mysore.

MATERIALS AND METHODS

Field experiment was conducted in the farmer's field of Chikkanahalli village, Mysore district, Karnataka, India, to analyze the effect of cyanobacterial biofertilizer (CBB) along with and without chemical fertilizer (NPK) on leaf yield and leaf quality traits of mulberry. Initially, the soil nutrient status viz., soil pH, organic carbon (OC), total nitrogen (N), available phosphorus (P), available potassium (K) and cyanobacteria spp. were recorded before conducting the experiment. For the study, three different doses of CBB (i) 90 kg/ha/crop, (ii) 105 kg/ha/crop and (iii) 120 kg/ha/crop were selected based on the earlier experimental works (Bose and Majumdar, 1999; Dasappa, 2000). Likewise three different doses of chemical fertilizers i.e., (i) 25% NPK: 15:6:6 kg/ha/crop, (ii) 50% NPK: 30:12:12 kg/ha/crop (iii) 100% NPK: 60:24:24 kg/ha/crop (recommended dose of CSR&TI, Mysore) were used. Three species of cyanobacteria viz., *Anabaena variabilis* (Av), *Nostoc muscorum* (Nm) and *Scytonema millei* (Sm) were used as CBB in the study. The pure cultures of these cyanobacteria in slants were obtained from Indian Agricultural Research Institute (IARI), New Delhi; they were sub-cultured and multiplied in the laboratory of the Department of Botany, University of Mysore, India. The large volume of multiplied cyanobacteria were lyophilized and made into powder to avoid secondary contamination. These lyophilized cyanobacteria were mixed individually with farmyard manure (FYM) and made as cyanobacterial biofertilizer (CBB). The field was kept wet for few days immediately after the application of CBB. Further, irrigation schedule was properly maintained in all the experimental plots. The application of CBB to the experimental plots was done by following the standard procedure (Venkataraman, 1972; Anonymous, 1978).

For the study, single and combination treatments of CBB and chemical fertilizers were computed such as:

- T1: Av (90kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T2: Nm (90kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T3: Sm (90kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T4: Av + Nm (90kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T5: Av + Sm (90kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T6: Nm + Sm (90kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T7: Av + Nm + Sm (90kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T8: Av + Nm + Sm (105kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T9: Av + Nm + Sm (120kg/ha/crop) + 50% NPK;
- T10: Av + Nm + Sm (120kg/ha/crop) + 25%NPK;
- T11: Av + Nm + Sm (120kg/ha/crop) without NPK and
- T12: 100% NPK (Control).

Two years old (0.20 ha.) K2 mulberry garden was selected and from this garden a total of 2400 plants grown with a spacing of 60cm × 60cm were taken for the study. For each treatment, 4 replications with 50 plants/replication were maintained in randomized block design (RBD). Initially the plants were pruned 30 cm above the ground level and CBB was applied 15 days after pruning. Cultural operation and application of FYM was done as per the norms of CSR&TI, Mysore (Krishnaswami, 1978). After 70 days of pruning, 20 plants were randomly selected replication-wise, from each of twelve treatments and leaf yield data were recorded for ten crops. The average of ten crops data on leaf yield was calculated treatment wise and converted to ton/ha/year.

From different CBB treated and control plots mature leaves (12th – 14th leaf from top) were collected replication / treatment wise and different leaf quality traits were estimated. Leaf Moisture Content (LMC %) and Moisture Retention Capacity (MRC %) after 6 hrs from harvest were estimated by following the method of Vijayan *et al.* (1996). Total chlorophyll content (mg/g of fresh weight) was estimated by adopting the procedure of Hiscox and Israelstam (1979). Nitrate reductase (NR) activity was also estimated in mature leaves (Scot and Neyra, 1979). Leaf samples collected were dried and used in triplicate for analysis of total protein content following Lowry *et al.* (1951), total amino acid content estimated by adopting ninhydrin method using leucine as standard (Spies, 1955). Nitrogen content was estimated by micro-kjeldahl method (Jackson, 1973). Sugar and starch contents (soluble carbohydrate) were estimated by the method of Dubios *et al.* (1956) and Mc. Cready *et al.* (1960) respectively. Further, to confirm the efficiency of CBB on leaf quality traits, a bioassay study was conducted with silkworm race PM × NB4D2 for three different seasons. Leaves from CBB treated (T9) and control (T12) plots were utilized for feeding the silkworm until spinning. At three different seasons, rearing data viz., larval duration, weight of 10 mature larvae (g), Effective Rate of Rearing (ERR) by number and by weight, Single cocoon weight, Single shell weight and Shell ratio (%) were recorded separately, later average of three seasons data was calculated and analyzed statistically (Snedecor and Cochran, 1967).

RESULTS AND DISCUSSION

The influence of different treatments of CBB with and without chemical fertilizers on soil nutrient parameters and on leaf quality traits was assessed and summarized in Table I and II. The soil pH in control (T12) plot was 8.2, but it was decreased to 7.3 to 8.0 in different CBB (T1 – T11) treated plots. It was reported that soil pH decreased in the cyanobacteria treated plot (Dasappa 2000). Cyanobacteria can change the soil pH towards neutrality (Hashem, 2001). Likewise, in control plot, the soil nutrients i.e., Organic carbon (OC), Nitrogen (N), Phosphorus (P) and Potassium (K) were 0.36%, 0.033%, 7.35kg/ha and 174.20kg/ha respectively. Whereas, in different CBB treated plots, the nutrients were found increased and the range of increase in the nutrients are, OC: 0.38 – 0.52%; N: 0.034 – 0.054%; P: 7.46 – 11.46kg/ha and K: 151.83 – 194.37kg/ha. The increase in soil nutrients was certainly due to the influence of CBB. Cyanobacteria produce extra cellular polymers of diverse chemical composition, especially exopolysaccharides that enhance microbial growth and as consequence, improve soil structure and exoenzyme activity (Caire *et al.*, 1997). In the present study, soil nutrients were high in T9; this was mainly due to the higher dose of CBB with 50% NPK fertilizers. In contrast, all the nutrients were low in T11 plot, probably due to total avoidance of chemical fertilizer in the treatment. It was observed that application of higher dose of CBB alone (T11) proved less effective in improving the soil nutrients. Cyanobacteria not only maintain the soil pH but also help to enhance soil nutrients, retain soil moisture and liberate different hormones that stimulate plant growth (Hashem, 2001; Meeks and Elahi, 2002).

Leaf quality traits:

The growth of silkworm (*Bombyx mori* L.) and production of quality cocoons depends on timely feeding of good quality mulberry leaves to silkworm. Therefore, it is most imperative to analyze different leaf quality traits such as leaf moisture content (LMC), moisture retention capacity (MRC), total chlorophyll, nitrogen, protein, amino acids and carbohydrate contents. The leaf quality traits estimated in different CBB treated (T1 – T11) and control (T12) plots were represented in Table II. LMC and MRC are two important factors in maintaining the nutrition level in mulberry leaves, which in turn improve its palatability for silkworm. These two traits are influenced by genetic and environmental factors (Vijayan *et al.*, 1997) and are also positively related with an increased growth of silkworm larvae (Paul *et al.*, 1992). In the present study, LMC and MRC were high in T9 (73.5% and 75.0% respectively) and were on par with control T12 (73.6% and 75.2%).

Table I. Effect of different CBB treatments on soil nutrients.

Tableau I. Effet de différents traitements CBB sur les nutriments du sol.

Treatment	Soil Status (pH)	Organic Carbon (%)	Total Nitrogen (%)	Available Phosphorus (kg/ha)	Available Potassium (kg/ha)
Traitement	Etat du sol (pH)	Carbone organique (%)	Azote total (%)	Phosphore disponible (kg / ha)	Potassium disponible (kg /ha)
T1: Av (90kg/ha/crop) + 50% NPK	7.7 ± 0.14	0.43 ± 0.14	0.043 ± 0.09	8.42 ± 0.32	179.43 ± 4.10
T2: Nm (90kg/ha/crop) +50%NPK	8.0 ± 0.15	0.45 ± 0.15	0.044 ± 0.07	8.52 ± 0.41	180.57 ± 7.16
T3: Sm (90kg/ha/crop) + 50% NPK	7.8 ± 0.16	0.44 ± 0.14	0.042 ± 0.10	8.37 ± 0.34	178.32 ± 9.12
T4: Av + Nm (90kg/ha/crop) + 50% NPK	7.6 ± 0.18	0.42 ± 0.17	0.043 ± 0.09	8.54 ± 0.19	175.54 ± 10.36
T5: Av + Sm (90kg/ha/crop) + 50% NPK	8.0 ± 0.17	0.42 ± 0.07	0.042 ± 0.08	8.47 ± 0.47	177.28 ± 9.42
T6: Nm + Sm (90kg/ha/crop) +50% NPK	7.6 ± 0.20	0.45 ± 0.06	0.043 ± 0.04	8.53 ± 0.31	176.84 ± 5.32
T7: Av + Nm +Sm (90kg/ha/crop) + 50% NPK	7.5 ± 0.19	0.46 ± 0.16	0.046 ± 0.04	8.60 ± 0.28	180.66 ± 8.10
T8: Av + Nm + Sm (105kg/ha/crop) + 50% NPK	7.4 ± 0.17	0.48 ± 0.14	0.050 ± 0.06	9.45 ± 0.27	188.54 ± 7.15
T9: Av + Nm + Sm (120 kg/ha/crop) +50% NPK	7.3 ± 0.17	0.52 ± 0.26	0.054 ± 0.11	11.46 ± 0.46	194.37 ± 9.26
T10: Av + Nm + Sm (120kg/ha/crop) + 25% NPK	7.4 ± 0.11	0.44 ± 0.15	0.048 ± 0.10	9.28 ± 0.41	178.44 ± 6.41
T11: Av + Nm + Sm (120kg/ha/crop)	7.3 ± 0.20	0.38 ± 0.16	0.034 ± 0.09	7.46 ± 0.32	151.83 ± 6.32
T12: 100%NPK (Control / Témoin)	8.2 ± 0.21	0.36 ± 0.26	0.033 ± 0.10	7.35 ± 0.28	174.20± 6.10
CD at 5%	NS	0.08	0.014	2.05	9.12

Av: *Anabaena variabilis*; Nm: *Nostoc muscorum*; Sm : *Scytonema millei*; NPK: Chemical fertilizers / Engrais chimiques.
kg / ha / crop / kg / ha / récolte.

Table II. Effect of different CBB treatments on leaf quality traits of mulberry.

Tableau II. Effet des différents traitements CBB sur les caractères qualitatifs de la feuille de mûrier.

Treatment	LMC (%)	MRC (%) (after 6 hrs of harvest)	Total Chlorophyll (mg/g.f.wt)	Protein (%)	Nitrogen (%)	Sugar (%)	Starch (%)	Total amino acid (mg/g dry wt.)	NR activity (μ g NO ₂ hr/g)	Leaf yield (ton /ha/yr)
Traitement		% MRC (après 6h de récolte)	Chlorophylle (mg/g pds f.)	Protéines (%)	Azote (%)	Sucres (%)	Amidon (%)	Ensemble des acides aminés (pds sec)	Activité NR (μ g NO ₂ hr/g)	Rendement foliaire (tonne / ha / année)
T1: Av (90 kg/ha/crop) + 50% NPK	71.8± 1.56	73.6± 0.91	2.45± 0.08	18.62± 0.09	3.42± 0.07	9.84± 0.16	10.22± 0.45	204.6± 10.16	7.8± 0.91	29.5± 3.20
T2: Nm (90 kg/ha/crop) +50%NPK	71.4± 0.98	73.2± 0.82	2.48± 0.07	19.28± 0.08	3.35± 0.08	9.75± 0.97	9.97± 0.91	212.8± 9.87	8.0± 0.80	30.0± 2.16
T3: Sm (90 kg/ha/crop) + 50% NPK	70.8± 0.81	74.0± 0.76	2.52± 0.06	19.17± 0.09	3.24± 0.04	10.18± 0.80	9.89± 0.78	207.4± 8.45	7.7± 0.70	30.5± 2.54
T4: Av + Nm (90 kg/ha/crop) + 50% NPK	72.3± 0.76	73.8± 0.65	2.50± 0.05	18.88± 0.12	3.51± 0.08	10.42± 0.91	10.54± 0.61	216.5± 9.65	7.8± 0.61	30.0± 3.12
T5: Av + Sm (90 kg/ha/crop) + 50% NPK	71.7± 0.78	73.5± 0.12	2.47± 0.07	19.14± 0.06	3.48± 0.07	10.20± 0.86	10.42± 0.70	215.2± 7.32	8.0± 0.72	30.7± 2.42
T6: Nm + Sm (90 kg/ha/crop) +50% NPK	72.2± 0.91	74.2± 0.15	2.54± 0.08	19.27± 0.07	3.37± 0.12	10.34± 0.75	10.37± 0.65	202.6± 6.56	8.2± 0.64	30.5± 1.76
T7: Av + Nm + Sm (90 kg/ha/crop) + 50% NPK	72.4± 0.86	73.7± 0.16	2.60± 0.09	19.35± 0.08	3.56± 0.15	10.56± 0.45	10.86± 0.58	217.2± 5.12	8.2± 0.55	31.0± 1.09
T8: Av + Nm + Sm (105 kg/ha/crop) + 50% NPK	72.8± 0.91	74.2± 0.21	2.63± 0.08	19.42± 0.06	3.54± 0.16	11.35± 0.32	11.15± 0.61	224.3± 4.91	8.5± 0.56	32.5± 1.12
T9: Av + Nm + Sm (120 kg/ha/crop) +50% NPK	73.5± 0.98	75.0± 0.56	2.85± 0.10	20.67± 0.05	4.17± 0.09	12.48± 0.57	11.37± 0.57	235.7± 8.10	9.7± 0.61	35.5± 1.07
T10: Av + Nm+ Sm (120 kg/ha/crop) +25% NPK	72.4± 1.12	74.3± 0.90	2.52± 0.09	18.73± 0.04	3.30± 0.08	10.18± 1.09	10.25± 0.71	214.5± 7.54	8.0± 0.71	28.0± 2.56
T11: Av + Nm + Sm (120 kg/ha/crop)	70.5± 1.06	71.6± 0.40	2.24± 0.06	15.82± 0.06	2.84± 0.09	8.76± 1.85	9.06± 0.81	176.8± 6.32	7.2± 0.72	24.3± 1.89
T12: 100 % NPK (Control / Témoin)	73.6± 1.51	75.2± 0.51	2.87± 0.08	20.44± 0.46	4.10± 0.09	12.44± 0.96	11.48± 0.91	238.6± 5.45	10.2± 0.57	36.2± 1.36
CD at 5%	NS	0.31	0.12	0.07	0.08	0.04	0.30	2.40	1.31	0.61

Av: *Anabaena variabilis*; Nm: *Nostoc muscorum*; Sm: *Scytonema millei*; NPK: Chemical fertilizers / Engrais chimiques.
kg/ha/crop / kg / ha / récolte.

Table III. Rearing performance and cocoon characters of silkworm in T9 and T12.

Tableau III. Performance d'élevage et caractères du cocon avec T9 et T12.

Treatment	Larval duration (days)	Wt of 10 mature larvae (g)	ERR		Single cocoon wt	Single shell wt.	Shell ratio (%)
			by No.	by Wt.			
Traitement	Durée larvaire (jours)	Poids de 10 larves mûres (g)	ERR		Poids d'un cocon (g)	Poids d'une coque (g)	Richesse soyeuse (%)
			en nombre	au poids			
T9: Av + Nm + Sm (120 kg/ha/crop) +50% NPK	28.07 ± 0.98	40.97 ± 0.62	8197 ± 32.6	13.95 ± 1.96	1.687 ± 0.09	0.298 ± 0.09	17.66 ± 1.36
T12: 100 % NPK (control / témoin)	28.12 ± 1.16	40.55 ± 1.54	8015 ± 54.6	13.32 ± 2.32	1.625 ± 0.16	0.284 ± 0.08	17.48 ± 2.56
t value / valeur t	NS	NS	2.14*	2.47*	NS	NS	NS

Av: *Anabaena variabilis* ; Nm: *Nostoc muscorum* ; Sm: *Scytonema milleio* ; NPK : Chemical fertilizers / Engrais chimiques.
 kg / ha / crop / kg /ha / récolte. ERR: Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage.

The leaf quality is usually determined based on higher LMC and MRC (Bongale and Chaluvachari, 1995; Sujathamma and Dandin, 2000). Further in T9, the reduced dose (50%) of chemical fertilizer did not affect the LMC and MRC. This may be due to the influence of CBB, which had mediated the moisture availability in the soil rhizosphere, thereby maintaining normal growth, water uptake and other metabolism in plants.

Chlorophyll content is an important quality trait, which determines the photosynthetic efficiency of a variety. Total chlorophyll content was high in T9 (2.85mg/gf.wt) and found on par with T12 (2.87mg/gf.wt.), while it was low in T11 (2.24mg/gf.wt.). The increased chlorophyll content in T9 was mainly due to higher dose of CBB along with 50% NPK fertilizers. It was reported that a higher chlorophyll content in leaves indicates the photosynthetic efficiency in mulberry (Sujathamma and Dandin, 2000). Low chlorophyll content in T11 clearly indicates that higher dose of CBB alone may not be able to supply the required nutrients for the normal growth and physiological activities of plants.

Next to leaf moisture content, total nitrogen and amino acid contents are the two important traits, which determine the leaf quality in mulberry (Machii, 1989). These two traits were high in T9 (4.17% and 235.7mg/g.dry wt.) and T12 (4.10% and 238.6mg/g.dry wt.), while these traits were low in T11 (2.84% and 176.8mg/g dry wt.). It was reported that varieties possessing higher nitrogen and amino acid contents in leaves are nutritively superior and positively related to growth and development of silkworm (Machii and Katagiri, 1991; Suryanarayana and Shivashankar Murthy, 2002). In case of T9 though the recommended dose of NPK fertilizers was reduced to half, the total nitrogen and amino acids contents were not affected, this may be due to attributed influence of CBB on the availability of mineral elements in the soil and their translocation in to the plant system, which later in turn enhance the synthesis of amino acids and other hormones etc., in the treatments.

Among the eleven CBB treatments, total protein content was found comparatively high in T9 (20.67%) and was on par with control T12 (20.44%). According to Horie (1980), dietary protein level should be 20 – 25%, which is required for optimal growth of silkworm larvae. The lower or reduced use of chemical (NPK) fertilizer in T9 did not affect the available quantity of protein content in the leaves, this may be due to influence of CBB which had compensated the reduced dosage of chemical fertilizers in the treatments. In mulberry leaves, carbohydrates are available in plenty and it was reported to be the main source of energy for silkworm (Hiratsuka, 1917 and Horie, 1978). The quantity of carbohydrate is determined based on the quantity of total sugar and starch available in leaves (Bose and Bindroo, 2001). Sugar and starch content were high in treatment T9 (12.48% and 11.37%) and was almost equal to that of control (12.44% and 11.48%). The results revealed that CBB had pronounced influence on biosynthesis of carbohydrates in the leaves. The low dose of NPK fertilizers in T9 was compensated efficiently by the addition of higher dose of CBB in the treatment.

Nitrate reductase (NR) activity is one of the most important regulatory enzymes in nitrogen metabolism, which catalyses the reduction of nitrate to nitrite, a rate limiting step in the utilization of nitrates in plants (Deckard *et al.*, 1973). NR activity was the highest in T9 (9.7 $\mu\text{gNo}_2/\text{hr/gf.wt.}$) and lowest in T11 (7.2 $\mu\text{gNo}_2/\text{hr/gf.wt.}$). NR activity in T9 was almost equal to that of control T12 (10.2 $\mu\text{gNo}_2/\text{hr/gf.wt.}$). In the present study, 50% curtailment in the recommended dose of chemical fertilizer did not affect the NR activity in T9 (Table I). This may be probably due to higher dose of CBB in T9, which had compensated the lower (50%) use of chemical fertilizer. Similarly, among the CBB treatments, leaf yield was found high in T9 (35.5 ton/ha/yr), while it was low in T11 (24.3 tons/ha/yr). In the present study, T9 besides showing high NR activity, also showed high leaf protein, nitrogen and amino acids. It was reported that NR activity is significantly correlated with leaf protein, leaf yield and other yield attributing characters, thus it can be used as an additional parameter for identifying the superior mulberry genotypes (Rao *et al.*, 2000).

From the study, it is understood that application of reduced (50%) dose of chemical fertilizers can be compensated by applying the required dose of CBB and due to the reason, leaf quality traits in T9 was found on par with T12 (control). In cyanobacteria, nitrogen / carbon fixation mechanism

is a unique biochemical process wherein the N fixation is mediated by the enzyme nitrogenase, which is well protected in the heterocyst cell (Hashem, 2001 and Ehira *et al.*, 2003). It is a thick walled, large transparent cell, occurs at regular intervals amidst series of vegetative cells of cyanobacteria. In symbiosis with plants, heterocyst cell formation in cyanobacteria increases 3 to 10 fold (Meeks and Elahi, 2002) and this leads to the enhancement of nitrogen fixation process. The fixed nitrogen is first reduced to ammonium in the heterocyst, later it is converted to glutamate and then passes as amino acids to adjacent vegetative cells (Thomas *et al.*, 1977). In return fixed carbon, probably sucrose flows from vegetative cells to heterocyst cells (Wolk, 1968; Schilling and Ehrensperger, 1985). Cyanobacteria during their intercellular biochemical processes secrete several nutrients, hormones and vitamins etc., which are absorbed by the plants.

Silkworm rearing performance:

The leaves from CBB treated (T9) and control (T12) plots were collected and used for bioassay study to analyze the influence of CBB on silkworm growth and cocoon characters. The average of three seasons rearing data recorded on silkworm growth and cocoon characters are summarized in Table III. In general, significant differences were not observed in rearing parameters between T9 and T12. However, a marginal improvement on silkworm growth and cocoon characters was recorded in T9 as compared to control (Table III). This clearly indicates the efficiency of CBB, which had compensated the lower use of fertilizers by not only fixing the atmospheric N, but also synthesizing required nutrients, vitamins, amino acids, hormones etc., which helps to improve the growth, metabolism and physiological activity of the host plants, with the result leaf quality might have been improved and thus feeding on such quality leaves maintained the normal growth and cocoon characters of silkworm.

Overall study reveals that mixture of three combination species of CBB treatment was found more effective than combination of two or single species CBB treatment. The highest dose of CBB (120kg/ha/crop) with 50% NPK fertilizers in T9 was found effective and showed superior performance with regard to leaf yield, leaf quality and cocoon parameters. In case of T10, the similar highest dose of CBB (120kg/ha/crop) with 25% NPK fertilizers exhibited moderate performance. Finally, the highest dose of CBB (120kg/ha/crop) without NPK fertilizers in T11 showed the least performance with respect to leaf yield and leaf quality traits probably due to total avoidance of chemical fertilizers in the treatment. In case of T8, CBB dose was slightly reduced (105kg/ha/crop) but chemical fertilizer dose was increased when compared to T10 and due to the reason T8 showed better performance than T10. It is clear from the study that higher dose of CBB along with NPK fertilizers to an extent of 50% is essential for maintaining the normal growth, yield and metabolism in plants. The present study confirms the earlier reports that mixture of three species of CBB combination proved to be the most effective in terms of maintaining the soil pH and improvement in soil environment, leaf yield, leaf quality and also in economizing the chemical fertilizer application by 50 % (Dasappa, 2000). Cyanobacteria cheap source of N do not cause pollution, improve soil fertility condition, water-holding capacity and maintain biodiversity of soil (Hashem, 2001). Therefore, CBB can be recommended to the sericulture farmers as cost effective and eco-friendly approach to sustain the productivity of both mulberry as well as cocoons. However the major constraint lies in culturing/ production of CBB in large quantities in the laboratory and supply to the farmers.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1978) Algal Technology for Rice Research, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India. Bulletin No. 9.
BERGMAN B., RAI A.N., JOHANSSON C., SODERBACK E. (1992) Cyanobacterial Plant symbiosis. *Symbiosis*. 14, 61 - 81.

- BONGALE U.D., CHALUVACHARI (1995) Evaluation of eight mulberry germplasm varieties by leaf biochemical and bioassay moulting studies. *Sericologia*, 35, 83 - 94.
- BOSE P.C., BINDROO B.B. (2001) A comparative biochemical study of seven promising mulberry (*Morus alba* L.) varieties under rainfed conditions of sub-tropical region. *Indian J. Seric.* 40, 171 - 173.
- BOSE P.C., MAJUMDAR S.K. (1999) Effect of Blue green algae on chemical and nutritional properties of salt affected soil of mulberry garden, productivity of mulberry and its economics. *Sericologia*. 39, 459 - 465.
- CAIRE G., STORNI D.E., CANO M., ZACCARO M.C., PALMA R.M., COLOMBO K. (1997) Exopolysaccharides of *Nostoc muscorum* Ag. (cyanobacteria) in the aggression of soil particles. *J. Appl. Phycol.* 9, 249 - 253.
- CURTIS S.E. (1992) Cyanobacteria, Molecular Genetics. *Encyclopedia of Microbiology* 1, 627 - 645.
- DAS P.K., KATIYAR R.S., HANUMANTHA GOWDA M., FATHIMA P.S., CHOUDHURY P. C. (1995) Effect of vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation on growth and development of mulberry (*Morus* spp) saplings. *Indian J. Seric.* 34, 15 - 17.
- DASAPPA (2000) Studies on the impact of soil microorganism on mulberry cultivation. Ph.D. thesis submitted to University of Mysore, Mysore. 1 - 400.
- DECKARD L., LAMBERT, R.J., HAGEMAN R.H. (1973) NR activity in corn leaves as related to yields of grain and grain protein. *Crop Sci.* 13, 343 - 350.
- DUBIOS M.K., GILLER K.A., HAMILTON K., RELERS P.A., SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar of related substances. *Ann. Chem.* 28, 350 - 356
- EHIRA S.M., OHMORI M., SATO N. (2003) Genome wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst forming cyanobacteria *Anabaena* sp. strain pcc 7120 *DNA. Res.* 10, 97 - 113.
- GANGAWAR S. K., THANGAVELU K. (1992) Evaluation of biofertilizers for establishment of mulberry (*Morus alba* L.). *Sericologia*. 32, 173 - 181.
- GANTAR M., PETER ROWELL, NIGEL W., KERBY, SUTHERLAND I.W. (1995) Role of extracellular polysaccharide in the colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) roots by N- fixing cyanobacteria. *Bio. Fertil Soil.* 19, 41 - 48.
- HASHEM M.A. (1997) Role of blue green algae in improving soil fertility and reclaiming salinity of soil Annual Report of BAURES, Financial Research Projects BAU: Mymensingh, India.
- HASHEM M.A. (2001) Problems and prospects of cyanobacteria biofertilizers for rice cultivation. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 881 - 888.
- HIRATSUKA E. (1917) Researches on the nutrition of the silkworm *Shangai Shkenjo Hoko Ku.* Tech Bull. 2, 353 - 412.
- HISCOX J. D., ISRAELSTAM G.F. (1979) A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57, 1332 - 1334.
- HORIE Y. (1978) Quantitative requirement of nutrition for growth of the silkworm. *Bombyx mori* L. *JARQ* 12, 211 - 217.
- HORIE Y. (1980) Recent advances in Sericulture. *Annu. Rev. Entomol.* 25, 49 - 71.
- HUANG G., QING FAN, SIGAL LECHNOYOSSEF, ELIZABETH WOJCUICH., PETER WOLK C., TAKAKAZU K., SATOSHI T. (2005) Clustered genes required for the synthesis of Heterocism envelope polysaccharide in *Anabaena* sp. strain pcc 7120. *Journal of Bacteriology*, 187, 1114 - 1123.
- ISLAM., HASHEM M.A. (1995) Role of blue green algae in improving soil environment. Bangladesh. *Journal of Training and Development.* 8, 112 - 118.
- JACKSON M.L. (1973) Nitrogen determination for soil and plant tissue In: *Soil Chemical Analysis*, Prentice- Hall of India, Pvt. (Ltd.) New Delhi, pp. 183 - 204.
- JACOBSON B.L., YOUNG KEE CHAE L., JOHN MARKLEY., IVAN RAYMUT HOLDEN M.H. (1993) Molecular structure of the oxidized recombinant Heterocyst [2Fe-2S] Ferredoxin from *Anabaena* 7120 determined to 1.7-Å Resolution *Biochemistry*. 32, 6788 - 6793.

- KRISHNASWAMI S. (1978) Mulberry cultivation in South India. Central Silk Board Publication, 1, 1 - 19.
- LOWRI O.H., ROSSENBROUGH N. J., FARR A.L., RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.
- MACHII H. (1989) Varietal differences of nitrogen and amino acid contents in mulberry leaves. Acta Sericul. Entomol. 1, 51 - 61.
- MACHII H., KATAGIRI K. (1991) Varietal differences in nutritive values of mulberry leaves for rearing silkworm. JARQ 25, 202 - 208.
- MACKERRAS A.H., YOUENS B.N., WEIR R.C., SMITH G.D. (1990) Cyanophycin involved in the integration of nitrogen and carbon metabolism in the Cyanobacteria *Anabaena cylindrica* and *Gloeotheca* grown on light /dark cycles. J. Gen. Microbial. 136, 2049 - 2056.
- McCREADY R. M., EUGGALE J., SILVER V., OWENS H.S. (1960) Determination of starch and amylase in vegetables. Application to Peas, Anal Chem., 29, 1156 - 1158.
- MEEKS J.C., ELAHI J. (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous Cyanobacteria in free living and plant associated symbiotic growth status. Microbial Mol. Biol. Rev. 66, 94 - 121.
- PAUL D.C. SUBBA RAO G., DEB D.C. (1992) Impact of dietary moisture on nutritional indices and growth of *Bombyx mori* and concomitant larval duration. J. Insect Physiol. 38, 229.
- PETERS G.A. (1990) Azolla and Plant cyanobacteria symbiosis: as pests of form and function. In: Polsinelli M. Materassi R. Vincenzini M. (eds) Nitrogen fixation. Proceeding of the 5th International symbiosis on nitrogen fixatoin with non-legumes. Kluwer Academic Dordrecht ppt. 377 - 388.
- RAI A. N., DERBA C.K., BERGMAN B. (2000) Cyanobacterium plant symbiosis Review. New Phytol. 147, 449 - 481.
- RAO D.M.R., REDDY M.P., REDDY B.K. SURYANARAYANA N. (2000) Nitrate reductase (NR) activity and its relationship with protein content, leaf yield and its components in mulberry (*Morus* spp.). Indian J. Seric. 39, 86 - 88.
- REDDY M.P., RAO D.M.R., VERMA R.S., SRINATH B., KATIYAR R.S. (1998) Response of S13 mulberry variety to VAM inoculation under semi-arid condition Indian J. Plant Physiol. 3, 194 -196
- REDDY M.P., RAM RAO D.M., VERMA R.S., SRINATH B., KATIYAR S. (2000) Effect of VAM inoculated and addition of phosphorus on the growth of S -13 mulberry saplings. Indian J. Seric. 39, 12 -15.
- SCHILLING N., EHRENSPERGER. K. (1985) Cellular differentiation of sucrose metabolism in *Anabaena variabilis*. Z. Naturforsch. 40c, 776 - 779.
- SCOT, D.B., NEYRA, C.A. (1979) Glutamine synthetase and Nitrate assimilation in sorghum leaves. Can. J. Bot. 57, 754 -758
- SNEDECOR W.G., COCHRAN G.W. (1967) Statistical methods. Oxford and IBH Publications, New Delhi, India. 1, 257 - 270.
- SPIES J. R. (1955) Colorimetric procedure for amino acids and phenol In : Methods in Enzymol. Colonick, S.P. and N.P.O. Kaplan (Eds), 3, 461- 477.
- STEWART W.D., ROWELL P., RAI A.N. (1983) Cyanobacteria eukaryotic plant symbiosis. Ann. Microbiol. (Paris) 134, 205 - 228.
- SUBBA RAO N.S. (1988) Biofertilizers - Potentialities and problems. In: S.P.Sen and P. Polit (Eds). Biofertilizers potentialities and problems. Plant Physiology from Nayaprakash, Calcutta, 7 - 16. Agriculture. Oxford/ IBH publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, India.
- SUJATHAMMA P., DANDIN S. B. (2000) Leaf quality evaluation of mulberry (*Morus* spp.) through chemical analysis. Indian J. Seric. 39, 117 - 121.
- SURYANARAYANA N., SHIVASHANKAR MURTHY T.C. (2002) Differences in amino acid contents in leaf blades of mulberry (*Morus* spp.) varieties. Adv. Plant Sci. 15, 475 - 481.
- THOMAS J., MEEKS J.C., WOLK C.P., SHAFER P.W., AUSTIN S.M., CHIEN W.S. (1977) Formation of glutamine from [¹³N] ammonia, [¹³N] dinitrogen, and [¹⁴C] Glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. J. Bacteriol. 129, 1535 - 1555.

- VENKATARAMAN G.S. (1972) In: Algal biofertilizer and rice cultivation today and Tomorrow. Printers and publishers, New Delhi 1 - 75.
- VENKATARAMAN L.V. (1986) Blue Green Algae as Biofertilizer In: CRC, Hand Book of Microalgal Mass Culture (ed). A. Richmond CRC Press. Boca Roton, Florida. 455 - 471.
- VIJAYAN K., TIKEDAR, A., DAS, K.K., ROY, B.N., PAWAN KUMAR T. (1996) Genotypic influence on leaf moisture content and moisture retention capacity in mulberry (*Morus* spp.). Bull. Seri. Res. 7, 95 - 98.
- VIJAYAN K., RAGHUNATH M.K., DASK K.K., TIKADER A., CHAKRABORTHY S.P., ROY B.N., QADRI S.M.H. (1997) Studies on leaf moisture of mulberry germplasm varieties. Indian J. Seric. 36, 155 - 157.
- WOLK C. P. (1968) Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindrica*. J. Bacteriol. 96, 2138 - 2143.

INFLUENCE DE L'ENGRAIS BIOLOGIQUE CYANOBACTERIEN SUR LES NUTRIMENTS DU SOL ET SUR LA QUALITE DE LA FEUILLE DE MURIER ET IMPACT SUR L'ELEVAGE DU VER A SOIE

D. M. RAM RAO, DASAPPA & T. SELVA KUMAR¹

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

1. Silkworm Seed Production Centre, NSSO, K. R. Nagar, Karnataka, Inde.

On a réalisé une expérience sur le terrain pour étudier l'effet d'un bioengrais cyanobactérien (CBB) avec et sans engrais chimique (NPK) sur les nutriments du sol et sur les caractères qualitatifs de la feuille de mûrier. On maintient onze parcelles de mûrier traitées aux CBB (T1 à T11) et une parcelle témoin (T12) et on enregistre les données sur le pH du sol, les nutriments du sol et sur les caractères qualitatifs de la feuille dans chacune de ces parcelles expérimentales pour chaque récolte. Les nutriments du sol augmentent tandis que le pH du sol baisse dans les différentes parcelles traitées avec le CBB, par comparaison à la parcelle témoin. Parmi les différents traitements CBB, T9 (Av. + Nm + Sm (120 kg/ha/récolte) + 50 % NPK) présente une performance supérieure pour les caractères qualitatifs de la feuille et est à égalité avec le témoin T12 (100 % NPK). L'évaluation biologique ne révèle pas de différence significative concernant la croissance du ver à soie et les caractères du cocon entre les traitements T9 et T12. Les résultats d'ensemble montrent que T9 est très efficace en termes d'amélioration des nutriments du sol et des caractères de qualité foliaire chez le mûrier. Par ailleurs, il est clair d'après l'étude qu'on peut compenser la diminution de 50 % de la dose d'engrais chimique par l'ajout d'une dose plus élevée de CBB. On peut donc recommander les CBB aux fermiers séricoles pour améliorer la fertilité du sol et les caractères qualitatifs de la feuille, tout en réalisant une économie de 50 % sur le coût des engrais chimiques.

INTRODUCTION

Les cyanobactéries sont un groupe différent de prokaryotes, largement distribué dans les environnements terrestre, marin et d'eau douce. Ce sont des bactéries photosynthétiques vivant librement qui existent individuellement ou en colonies dont certaines sont en forme de filament (Curtis, 1992 ; Jacobson et coll., 1993). Les cyanobactéries les plus courantes en forme de filament sont les espèces *Anabaena* et *Nostoc*, puisque ces cyanobactéries possèdent des cellules végétatives normales et des hétérocystes spécialisés qui sont impliquées respectivement dans la photosynthèse et dans la fixation de l'azote (Meckerras et coll., 1990 ; Jacobson et coll., 1993 ; Ehira et coll., 2003 ; Huang et coll., 2005). Les cyanobactéries sont capables de former une association symbiotique avec de nombreuses plantes et champignons (Perter, 1990 ; Bergman et coll., 1992 ; Meeks et Elahi, 2002). Les cyanobactéries fixent l'azote atmosphérique en association avec les plantes et libèrent de la matière organique, qui est absorbée par les plantes (Gantar et coll., 1995 ; Rai et coll., 2000). On utilise aussi les cyanobactéries comme engrais biologiques chez plusieurs cultures agricoles (Venkataraman, 1986 ; Subba Rao, 1988 ; Ganagawar et Thangavelu, 1992 ; Bose et Majumdar, 1999 ; Dasappa, 200).

Au cours des deux dernières décennies, on a abondamment utilisé les bioengrais comme les *Azotobacter*, les *Azospirillum*, les mycorhizes arbusculaires vésiculaires (VAM) et les cyanobactéries pour minimiser l'utilisation fréquente d'engrais chimiques, dans le but d'améliorer l'état du sol et la

croissance de la plante (Venkataraman, 1986 ; Subba Rao, 1988 ; Gangawar et Thangavelu, 1992 ; Das et coll., 1995 ; Bose et Majumdar, 1999). On a rapporté que ces engrais biologiques ne sont pas nuisibles à l'environnement, sont économiques et bénéfiques pour le mûrier (Das et coll., 1995 ; Reddy et coll., 2000 et Dasappa, 2000). Cependant, il n'existe que quelques rapports sur l'utilisation exclusive des cyanobactéries comme engrais biologiques chez le mûrier (Bose et Majumdar, 1999 et Dasappa, 2000). Les premiers chercheurs n'ont pas tellement étudié l'influence des CBB sur les nutriments du sol et sur les caractères qualitatifs de la feuille chez le mûrier. Nous avons donc entrepris cette étude pour évaluer l'efficacité des bio-engrais cyanobactériens, avec ou sans engrais chimiques, sur l'état du sol, sur le rendement foliaire et sur les caractères qualitatifs de la feuille de mûrier et leur influence sur les paramètres d'élevage du ver à soie dans les conditions tropicales de Mysore.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons réalisé l'expérience sur le terrain d'un fermier dans le village de Chikkanahalli, dans la zone de Mysore, dans le Karnataka, en Inde pour analyser l'effet des bioengrais cyanobactériens (CBB) avec et sans engrais chimique (NPK) sur le rendement foliaire et sur les caractères qualitatifs de la feuille de mûrier. Au début, on enregistre les données sur les nutriments du sol, c'est-à-dire sur le pH du sol, le carbone organique (OC), l'azote total (N), le phosphore disponible (P), le potassium disponible (K) et les cyanobactéries spp. avant d'entreprendre l'expérience. Pour l'étude, on sélectionne trois doses différentes de CBB (i) 90 kg / ha / récolte, (ii) 105 kg / ha / récolte et (iii) 120 kg / ha / récolte d'après les expériences précédentes (Bose et Majumdar, 1999 ; Dasappa, 2000). De même, on utilise trois doses différentes d'engrais chimiques, c'est-à-dire (i) 25 % NPK : 15 : 6 : 6 kg / ha / récolte, (ii) 50 % NPK : 30 : 12 : 12 kg / ha / récolte (iii) 100 % NPK / 60 / 24 / 24 kg / ha / récolte (dose recommandée du CSR& T1, Mysore). Dans l'étude, on utilise trois espèces de cyanobactéries, c'est à dire *Anabaena variabilis* (Av.), *Nostoc muscorum* (Nm) et *Scytonema millei* (Sm). On obtient les cultures pures de ces cyanobactéries auprès de l'Institut de Recherche Agricole Indien (IARI), de New Delhi ; puis on en fait des sous cultures et on les multiplie au laboratoire du Département de Botanique, de l'Université de Mysore, en Inde. La quantité importante de cyanobactéries multipliées est lyophilisée et réduite en poudre pour éviter la contamination secondaire. On mélange ces cyanobactéries lyophilisées individuellement avec du fumier de ferme (FYM) et on en fait un engrais biologique cyanobactérien (CBB). On maintient le terrain humide pendant quelques jours immédiatement après l'application de CBB. De plus, on suit le calendrier d'irrigation dans toutes les parcelles expérimentales. On procède à l'application de CBB dans les parcelles expérimentales en suivant la procédure standard (Venkataraman, 1972 ; Anonyme, 1978).

Pour l'étude, on procède aux traitements individuels et combinés de CBB et d'engrais chimiques comme suit :

- T1 Av (90 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T2 Nm (90 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T3 Sm (90 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T4 Av + Nm (90 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T5 Av + Sm (90 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T6 Nm + Sm (90 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T7 Av + Nm + Sm (90 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T8 Av + Nm + Sm (105 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T9 Av + Nm + Sm (120 kg / ha / récolte) + 50 % NPK
- T10 Av + Nm + Sm (120 kg / ha / récolte) + 25 % NPK
- T11 Av + Nm + Sm (120 kg / ha / récolte) sans NPK et
- T12 100 % NPK (témoin)

Pour l'étude, on sélectionne une muraie de variété K2 de deux ans (0,20 ha) et on prend un ensemble de 2400 plants cultivés avec un espacement de 60 × 60 cm dans cette muraie. Pour chaque traitement, on maintient 4 répétitions avec 50 plants / répétition, selon une conception aléatoire en blocs (RBD). Au début, on taille les plants 30 cm au dessus du sol et on applique les CBB 15 jours après la taille. On procède aux opérations culturales et à l'application de FYM d'après les normes du CSR&TI de Mysore (Krisnaswami, 1978). Soixante dix jours après la taille, on sélectionne 20 plants au hasard en fonction des répétitions pour chacun des douze traitements et on enregistre les données sur le rendement foliaire pour dix récoltes. On calcule la moyenne des données de rendement foliaire pour dix récoltes, en fonction des traitements, et on la convertit en tonnes / ha / année.

On recueille les feuilles mûres (12^{ème} à 14^{ème} feuille à partir du haut) dans les différentes parcelles traitées aux CBB et dans les parcelles témoins, en fonction de la répétition / du traitement et on estime les différents caractères de qualité foliaire. On estime la Teneur en Eau de la Feuille (% LMC) et la Capacité de Rétention de l'Humidité (MRC %) 6 heures après la récolte, en suivant la méthode de Vijayan et coll., (1996). On estime la teneur totale en chlorophylle (mg / g de poids frais) en adoptant la procédure d'Hiscox et Israelstam (1979). On estime aussi l'activité nitratre réductase (NR) chez les feuilles mûres (Scot et Neyra, 1979). On sèche les échantillons de feuilles recueillis et on les utilise en trois exemplaires pour l'analyse de la teneur totale en protéines d'après la procédure de Lowry et coll., (1951), on estime la teneur totale en acides aminés en adoptant la méthode ninhydrine en utilisant la leucine comme étalon (Spies, 1955). On estime la teneur en azote par la méthode micro-kjeldahl (Jackson, 1973). On estime les teneurs en sucres et en amidon (hydrates de carbone solubles) d'après la méthode respectivement de Dubois et coll., (1956) et de Mc Cready et coll., (1960). Par ailleurs, pour confirmer l'efficacité des CBB sur les caractères de qualité foliaire, on procède à une étude d'évaluation biologique avec la race de ver à soie PM × NB4D2 pendant trois saisons différentes. On utilise les feuilles des parcelles traitées aux CBB (T9) et témoins (T12) pour l'alimentation du ver à soie jusqu'au filage. On enregistre séparément les données d'élevage, c'est-à-dire la durée larvaire, le poids de 10 larves mûres (g), le taux effectif d'élevage en nombre et en poids, le poids d'un cocon, le poids d'une coque et la richesse soyeuse pour trois saisons différentes, ensuite on calcule les données sur la moyenne des trois saisons et on les analyse sur le plan statistique (Snedecor et Cochran, 1967).

RESULTATS ET DISCUSSION

On évalue l'influence des différents traitements de CBB avec et sans engrais chimiques sur les paramètres des nutriments du sol et sur la qualité de la feuille. Les résultats sont résumés dans les Tableaux I et II. Le pH du sol chez le témoin (T12) est de 8,2, mais il baisse entre 7,3 et 8,0 dans les différentes parcelles traitées aux CBB (T1-T11). On a rapporté que le pH du sol baisse dans la parcelle traitée aux cyanobactéries (Dasappa, 2000). Les cyanobactéries peuvent changer le pH du sol vers la neutralité (Hashem, 2001). De même, dans la parcelle témoin, les nutriments du sol, c'est-à-dire le carbone organique (OC), l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) sont de respectivement 0,36 % ; 0,033 % , 7,35 kg / ha et 174,20 kg / ha. Dans les différentes parcelles traitées aux CBB, on constate que les nutriments augmentent et la fourchette d'augmentation des nutriments est la suivante : OC : 0,38 à 0,52 % ; N : 0,034 - 0,054 % ; P : 7,46 - 11,46 kg / ha et K : 151,83 - 194,37 kg / ha. L'augmentation des nutriments du sol est certainement due à l'influence des CBB. Les cyanobactéries produisent des polymères extracellulaires de composition chimique variée, surtout des exopolysaccharides, qui améliorent la croissance microbienne et par conséquent qui améliorent la structure du sol et l'activité des exoenzymes (Caire et coll., 1997). Dans cette étude, les nutriments du sol sont élevés avec T9 ; cela est principalement dû à la dose plus élevée de CBB associée à 50 % d'engrais NPK. A l'opposé, tous les nutriments sont faibles dans la parcelle T1, probablement en raison de l'absence d'engrais chimie dans le traitement. On observe que l'application d'une dose plus élevée de CBB seuls (T11) s'avère moins efficace pour améliorer les nutriments du sol. Les

cyanobactéries non seulement maintiennent le pH du sol mais contribuent aussi à augmenter les nutriments du sol, à retenir l'humidité du sol et à libérer différentes hormones qui stimulent la croissance de la plante (Hashem, 2001 ; Meeks et Elahi, 2002).

Caractères de qualité foliaire :

La croissance du ver à soie (*Bombyx mori* L.) et la production de cocons de qualité dépendent de l'alimentation du ver à soie en temps voulu avec des feuilles de mûrier de qualité. Il est donc impératif d'analyser les différents caractères de qualité foliaire, tels que la teneur en eau de la feuille (LMC), la capacité de rétention de l'humidité (MRC), la teneur totale en chlorophylle, en azote, en protéines et en hydrates de carbone. Les caractères de qualité foliaire estimés dans différentes parcelles traitées aux CBB (T1 à T11) et témoins (T12) sont présentés dans le Tableau II. La LMC et la MRC sont deux facteurs importants pour maintenir le niveau de nutrition dans les feuilles de mûrier, qui à leur tour améliorent la saveur pour le ver à soie. Ces deux caractères sont influencés par des facteurs génétiques et environnementaux (Vijayan et coll., 1997) et sont aussi positivement associés avec une augmentation de la croissance des larves de ver à soie (Paul et coll., 1992). Dans cette étude, la LMC et la MRC sont élevées avec T9 (respectivement 73,5 % et 75 %) et sont égales à celles du témoin T12 (73,6 % et 75,2 %).

La qualité de la feuille est en général déterminée d'après une LMC et une MRC supérieures (Bongale et Chaluvachari, 1995 ; Sujathamma et Dandin, 2000). Par ailleurs, avec T9, la dose réduite (50 %) d'engrais chimique n'affecte pas la LMC et la MRC. Cela pourrait être dû à l'influence des CBB, qui ont modifié la disponibilité en eau dans la rhizosphère du sol, ce qui maintient donc la normalité de la croissance, de l'absorption de l'eau ainsi que d'autres métabolismes chez les plantes.

La teneur en chlorophylle est un caractère qualitatif important, qui détermine l'efficacité photosynthétique d'une variété. La teneur totale en chlorophylle est élevée avec T9 (2,85 mg / g pds. f.), qui est égal à T12 (2,87 mg / g pds f.), tandis qu'elle est faible avec T11 (2,24 mg / g pds. f.). L'augmentation de la teneur en chlorophylle avec T9 est principalement due à la dose plus élevée de CBB ainsi qu'à 50 % d'engrais NPK. On a rapporté qu'une teneur plus élevée en chlorophylle dans les feuilles indique l'efficacité photosynthétique chez le mûrier (Sujathamma et Dandin, 2000). La faible teneur en chlorophylle avec T11 indique clairement que la dose plus élevée de CBB seule pourrait ne pas être capable d'apporter les nutriments requis pour la croissance et les activités physiologiques normales des plantes.

À côté de la teneur en eau de la feuille, les teneurs totales en azote et en acides aminés sont deux caractères importants, qui déterminent la qualité de la feuille chez le mûrier (Machii, 1989). Ces deux caractères sont élevés avec T9 (4,17 % et 235,7 mg / g pds sec) et avec T12 (4,10 % et 238,6 mg / g pds sec), tandis que ces caractères sont faibles avec T11 (2,84 % et 176,8 mg / g pds sec). On a rapporté que les variétés qui possèdent des teneurs supérieures en azote et en acides aminés dans les feuilles sont supérieures sur le plan nutritif et positivement associées avec la croissance et le développement du ver à soie (Machii et Katagiri, 1991 ; Suryanarayana et Shivashankar Murthy, 2002). Dans le cas de T9, bien que la dose recommandée d'engrais NPK soit diminuée de moitié, cela n'affecte pas la teneur totale en azote et en acides aminés ; cela pourrait être dû à l'influence que l'on attribue aux CBB sur la disponibilité en éléments minéraux dans le sol et à leur translocation dans le système de la plante, qui plus tard améliorent à leur tour la synthèse des acides aminés et d'autres hormones, etc.. dans les traitements.

Parmi les onze traitements CBB, la teneur totale en protéines s'avère comparativement élevée avec T9 (20,67 %) et à égalité avec le témoin T12 (20,44 %). Selon Horie (1980), le niveau de protéines alimentaires devrait être de 20 à 25 %, ce qui est nécessaire à la croissance optimale des larves de vers à soie. La diminution de l'utilisation d'engrais chimiques (NPK) avec T9 n'a pas d'effet sur la quantité de protéines disponibles dans les feuilles ; cela pourrait être dû à l'influence des CBB, qui ont compensé la diminution de la dose d'engrais chimiques dans les traitements. Dans les feuilles de mûrier, les hydrates de carbone sont disponibles en grande quantité et on a rapporté qu'ils sont la

principale source d'énergie pour le ver à soie (Hiratsuka, 1917 et Horie, 1978). La quantité d'hydrates de carbone est déterminée d'après la quantité totale de sucres et d'amidon disponibles dans les feuilles (Bose et Bindroo, 2001). La teneur en sucres et en amidon est élevée avec le traitement T9 (12,48 et 11,37 %) et est presque égale à celle du témoin (12,44 % et 11,48 %). Les résultats révèlent que les CBB ont une influence prononcée sur la biosynthèse des hydrates de carbone dans les feuilles. La faible dose d'engrais NPK avec T9 est efficacement compensée par l'ajout d'une dose plus élevée de CBB dans le traitement.

La nitrate réductase (NR) est l'une des enzymes régulatrices les plus importantes dans le métabolisme de l'azote, qui catalyse la réduction de nitrate en nitrite, une étape de limitation du taux d'utilisation des nitrates chez les plantes (Deckard et coll., 1973). L'activité NR est la plus élevée avec T9 (9,7 $\mu\text{g No}_2$ / hr / g pds f.) et la plus faible avec T11 (7,2 $\mu\text{g No}_2$ / hr / g pds f.). L'activité NR avec T9 est presque égale à celle du témoin T12 (10,2 $\mu\text{g No}_2$ / hr / g pds f.). Dans cette étude, la diminution de la dose recommandée d'engrais chimique de 50 % n'affecte pas l'activité NR avec T9 (Tableau I). Cela est probablement dû à la dose plus élevée de CBB avec T9, qui compense l'utilisation plus faible (50 %) d'engrais chimique. De même, parmi les traitements CBB, le rendement foliaire s'avère élevé avec T9 (35,5 tonnes / ha / an), tandis qu'il est faible avec T11 (24,3 tonnes / ha / an). Dans cette étude, T9 montre non seulement une activité NR élevée, mais présente aussi des protéines, de l'azote et des acides aminés élevés de la feuille. On a rapporté que l'activité NR est corrélée de manière significative avec les protéines de la feuille, le rendement foliaire et d'autres caractères contribuant au rendement, on peut donc l'utiliser comme un paramètre supplémentaire pour identifier les génotypes de mûrier supérieurs (Rao et coll., 2000).

D'après l'étude, on comprend que l'application d'une dose réduite (50 %) d'engrais chimiques peut être compensée par l'application de la dose nécessaire de CBB et pour cette raison, les caractères de qualité foliaire avec T9 sont à égalité avec ceux de T12 (témoin). Chez les cyanobactéries, le mécanisme de fixation de l'azote / du carbone est un processus biochimique unique où la fixation de l'azote est modifiée par la nitrogénase, qui est bien protégée dans la cellule de l'hétérocyste (Hashem, 2001 et Ehir et coll., 2003). C'est une grande cellule transparente, à paroi épaisse, qui se produit à intervalles réguliers au milieu d'une série de cellules végétatives de cyanobactéries. Chez les cyanobactéries, la formation de cellules hétérocystes est multipliée entre 3 et 10 fois en symbiose avec les plantes (Meeks et Elahi, 2002) et cela entraîne l'amélioration du processus de fixation de l'azote. L'azote fixé est d'abord réduit à de l'ammonium dans l'hétérocyste, puis il est converti en glutamate et il passe ensuite en tant qu'acides aminés dans les cellules végétatives voisines (Thomas et coll., 1977). En retour, le carbone fixé, probablement du saccharose quitte les cellules végétatives pour les cellules hétérocystes (Wolk, 1968 ; Schillining et Ehrensperger, 1985). Pendant leurs processus biochimiques intercellulaires, les cyanobactéries sécrètent plusieurs nutriments, hormones et vitamines qui sont absorbés par les plantes.

Performance d'élevage du ver à soie :

On recueille les feuilles des parcelles traitées avec des CBB (T9) et des parcelles témoins (T12) et on les utilise pour l'évaluation biologique pour analyser l'influence des CBB sur la croissance du ver à soie et sur les caractères du cocon. La moyenne des données d'élevage pour les trois saisons concernant la croissance du ver à soie et les caractères du cocon est présentée dans le Tableau III. En général, on n'observe pas de différences significatives concernant les paramètres d'élevage entre T9 et T12. Cependant, on enregistre une amélioration marginale de la croissance du ver à soie et des caractères du cocon avec T9 par comparaison au témoin (Tableau III). Cela indique clairement l'efficacité des CBB, qui ont compensé l'utilisation inférieure d'engrais, non seulement en fixant l'azote atmosphérique, mais aussi en synthétisant les nutriments, les vitamines, les acides aminés, les hormones requis, etc..., ce qui aide à améliorer la croissance, le métabolisme et l'activité physiologique des plantes hôtes, par conséquent, la qualité de la feuille a dû s'améliorer et

l'alimentation avec des feuilles de cette qualité maintient la normalité de la croissance et des caractères du cocon chez le ver à soie.

L'étude générale révèle que le mélange de trois combinaisons d'espèces de CBB s'avère plus efficace que la combinaison de deux ou d'une espèce CBB. La dose la plus élevée de CBB (120 kg / ha / récolte) avec 50 % d'engrais NPK (T9) s'avère efficace et donne une performance supérieure pour le rendement foliaire, la qualité de la feuille et les paramètres du cocon. Dans le cas de T10, la dose similaire plus élevée de CBB (120 kg / ha / récolte) avec 25 % d'engrais présente une performance modérée. Enfin, la dose la plus élevée de CBB (120 kg / ha / récolte) sans engrais NPK avec T11 présente la performance la plus faible en matière de rendement foliaire et pour les caractères qualitatifs de la feuille, probablement en raison de l'absence totale d'engrais chimiques dans le traitement. Dans le cas de T8, la dose de CBB est légèrement réduite (105 kg / ha / récolte), mais la dose d'engrais chimique augmente par comparaison à T10 et pour cette raison T8 présente une meilleure performance que T10. Il est clair d'après l'étude que la dose supérieure de CBB avec 50 % d'engrais NPK est essentielle pour maintenir la normalité de la croissance, du rendement et du métabolisme chez les plantes. L'étude actuelle confirme les rapports antérieurs selon lesquels le mélange de trois combinaisons d'espèces de CBB s'avère le plus efficace, en termes de maintien du pH du sol et d'amélioration de l'environnement du sol, du rendement foliaire, de la qualité de la feuille et également pour diminuer l'application d'engrais chimique de 50 % (Dasappa, 2000). Les cyanobactéries, source d'azote bon marché, ne polluent pas, améliorent la fertilité du sol, la capacité de rétention de l'eau et maintiennent la biodiversité du sol (Hashem, 2001). On peut donc recommander les CBB aux fermiers séricicoles comme approche bon marché et écologique pour soutenir à la fois la productivité du mûrier et des cocons. Cependant, la principale contrainte repose dans la culture / la production des CBB en grande quantité en laboratoire et dans leur apport aux fermiers.

**NESOLYNX THYMUS, A BIO-CONTROL AGENT OF UZI FLY,
BLEPHARIPA ZEBINA WALKER IN TASAR SILKWORM,
ANTHERAEA MYLITTA D.**

RAM KISHORE*, A. K. DEBNATH AND N. SURYANARAYANA

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi – 835 303 (INDIA).

The Uzi fly, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae) is a larval endo-parasitoid of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury and oak tasar silkworm, *A. proylei* Jolly (Lepidoptera: Saturniidae). The silkworm crop loss due to uzi fly has been estimated to the tune of 15–20% resulting in reduction in production and productivity. Efforts were made to control uzi fly through biological means. Eight indigenous parasitoids of uzi fly were collected from field and identified by Pest Management Laboratory of Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi. The studies have indicated the superiority of *Nesolynx thymus* (Girault) (Eulophidae) as bio-control agent for uzi fly, *B. zebina* over other parasitoids.

Although biological aspects of *N. thymus* (a pupal parasitoid of uzi fly) had been dealt by several workers, the field level efficiency was not worked out. In order to check uzi fly infestation in tasar silkworm the study was undertaken in the field of different tasar growing states. The present study has revealed the host searching ability of the natural enemy and its potentiality in controlling the primary parasitoid. Besides, the results also put forth the efficacy of *N. thymus* in different agro-climatic zones of Jharkhand, Orissa and Imphal (Manipur).

The results have revealed that *N. thymus* has an ability to search and parasitise uzi puparia in all the directions up to a distance of 65 meters. Average parasitisation of uzi puparia by *N. thymus* recorded was $75.18\% \pm 8.97$. The findings clearly indicated that the parasitoid possessed certain desirable characters of a novel bio-control agent to prevent uzi fly. Hence, release of *N. thymus* is recommended for tasar growing fields to control uzi fly.

Keywords: *Antheraea mylitta*, endo-parasitoid, *Blepharipa zebina*, Bio-control agent; *Nesolynx thymus*.

INTRODUCTION

The tachinid fly, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae) is a larval endo-parasitoid of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury and oak tasar silkworm, *A. proylei* Jolly (Lepidoptera: Saturniidae) (Jolly *et al.*, 1974; Singh and Thangavelu, 1991). The silkworm crop loss due to uzi fly has been estimated to the tune of 15–20% resulting in reduction in production and productivity (Jolly *et al.*, 1974; Singh and Thangavelu, 1991). Sometimes the loss due to this fly pest is about 40% in tropical tasar zones (Chaturvedi *et al.*, 1986; Singh and Thangavelu, 1991). Efforts were made to control uzi fly through biological means (Kishore *et al.*, 1996, 1999 & 2000; Singh and Thangavelu, 1991). Eight indigenous parasitoids of uzi fly namely *Nesolynx thymus* (Girault), *Tetrastichus howardi* (Olliff.), *Pediobius* sp. (Eulophidae), *Spalangia endius* Walker, *Trichomalopsis apantelectena* (Crawford) (Pteromalidae), *Brachymeria lasus* Walker, *Dirhinus himalayanus*

* E. mail: rkishor03@yahoo.co.in and ramkishore56@rediffmail.com

Westwood (Chalcididae) and *Trichopria* sp. (Diapriidae) were collected from field and identified by Pest Management Laboratory of Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi (Kishore *et al.*, 1999; Singh and Thangavelu, 1991). The studies have indicated the superiority of *Nesolynx thymus* (Girault) (Eulophidae) as bio-control agent for uzi fly, *B. zebina* over other parasitoids.

Although biological aspects of *N. thymus* (a pupal parasitoid of uzi fly) had been dealt by several workers (Kishore *et al.*, 1996, 1999 & 2000; Singh and Thangavelu, 1991), the field level efficiency was not worked out. In order to check uzi fly infestation in temperate and tropical tasar silkworm the study was undertaken in the field of different tasar growing states. The present study has revealed the host searching ability of the natural enemy and its potentiality in controlling the primary parasitoid. Besides, the results also put forth the efficacy of *N. thymus* in different agro-climatic zones of Jharkhand, Orissa and Imphal (Manipur). Screening of *N. thymus* (gregarious-parasitoid) in the laboratory on the basis of searching and parasitizing ability to uzi puparia has indicated enormous potentiality of using them for biological control of *B. zebina* (Kishore *et al.*, 1999).

MATERIALS AND METHODS

Silkworm races like *Antheraea mylitta* and *A. proylei* were used as test animal reared on the bushes of tasar food plants following the improved method of rearing (Jolly, 1972). The crop wise rearing period of tropical tasar silkworm was June – July (I – Crop), August – September (II – Crop) and October – December (III – Crop) and of temperate tasar silkworm was March – April (I – crop / spring crop), June – July (II – crop / rainy crop) and September – October (III – crop / autumn crop). *Nesolynx thymus* was mass multiplied in the insectary of Entomology laboratory of C.T.R.T.I., Ranchi, India at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH and photoperiod of 12h L: 12h D following the methods evolved by Kishore *et al.*, 2001. For release of the parasitoid silkworm rearing fields of Hatgamhria and Kharsawan in Jharkhand, Bangariposi and Baripada in Orissa and Imphal in Manipur were selected. One isolated silkworm rearing field (in each locality) was selected as control. 1, 00,000 adults of *N. thymus* were released for 100 Disease free laying (Dfls) rearing field are as per schedule (Kishore *et al.*, 2005).

After eclosion, the adults of *N. thymus*, adult parasitoids were fed on 50% aqueous honey solution and maintained in the insectary for one day to ensure mating (Kishore *et al.* 2001). Five replications were maintained for collection of data for each locality.

Prior to release of the parasitoid, a database on uzi fly infestation of both treatment and control were collected. An average of 15.4% and 27.14% uzi infestation was recorded in tropical and temperate tasar respectively. Parasitoids were released in the late evening both during silkworm rearing and after the harvest of cocoons. To investigate the infestation rate of uzi fly puparia by the released parasitoids, 500 puparia (Two day old) were kept in five locations having 100 puparia in each location in a rearing area of 100 disease free layings. The observations on infestation rate of uzi fly puparia by the parasitoids were recorded in all the crop seasons. Same numbers of puparia were kept in control. The data collected were analyzed statistically to determine the level of significance (Fisher and Yates, 1963) following one – way ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of parasitisation of uzi puparia by the released parasitoids are presented in Fig. 1. The parasitisation percentage of uzi puparia by *N. thymus* in I, II and III - crop after release were 74.26, 75.34 and 77.11 in tasar rearing area of Jharkhand; 65.10, 70.28 and 75.30 in tasar rearing area of Orissa and 76.54, 80.36 and 82.20 in oak tasar rearing area of Manipur respectively. The data revealed that the parasitisation percentage of uzi fly puparia by parasitoids after first crop release was not found significantly different when compared to release of parasitoids in different states of tasar growing areas. Similarly significant difference was not found in the parasitisation percentages of the uzi

puparia recorded during II and III crop of tasar and oak tasar silkworm rearing (Fig. 1). The results indicate that to achieve maximum parasitisation of uzi fly puparia, *N. thymus* should be released at regular interval in all the silkworm rearing crop seasons for its establishment.

The average uzi fly infestation percentage on silkworm in treatment during I, II, and III crop seasons in tasar silkworm rearing area of Jharkhand were 5.25, 6.20 and 6.92; in tasar silkworm rearing area of Orissa were 3.12, 3.72 and 5.56 and in oak tasar silkworm rearing area of Manipur were 6.45, 9.42 and 9.90 respectively while in control the uzi fly infestation percentage were found to be 13.62, 17.50 and 32.38 in Jharkhand rearing; 5.54, 7.80 and 15.58 in Orissa rearing and 16.50, 29.10 and 35.81 in the rearing of oak tasar at Manipur. The data revealed that the uzi fly infestation in control area was significantly higher ($P < 0.05$) compared to treatment during all the three crop seasons (Table I). Kumar *et al.* (1993) reported that *N. thymus* was highly effective in parasitising uzi fly, *Exorista sorbillans* puparia throughout the year.

Dispersal ability is the most desirable characteristic of an efficient natural enemy. When *N. thymus* were released periodically at different distances of silkworm rearing fields and at grainages, it was found that the parasitoid was capable of dispersing and searching the host puparia located up to a distance of 65 m.

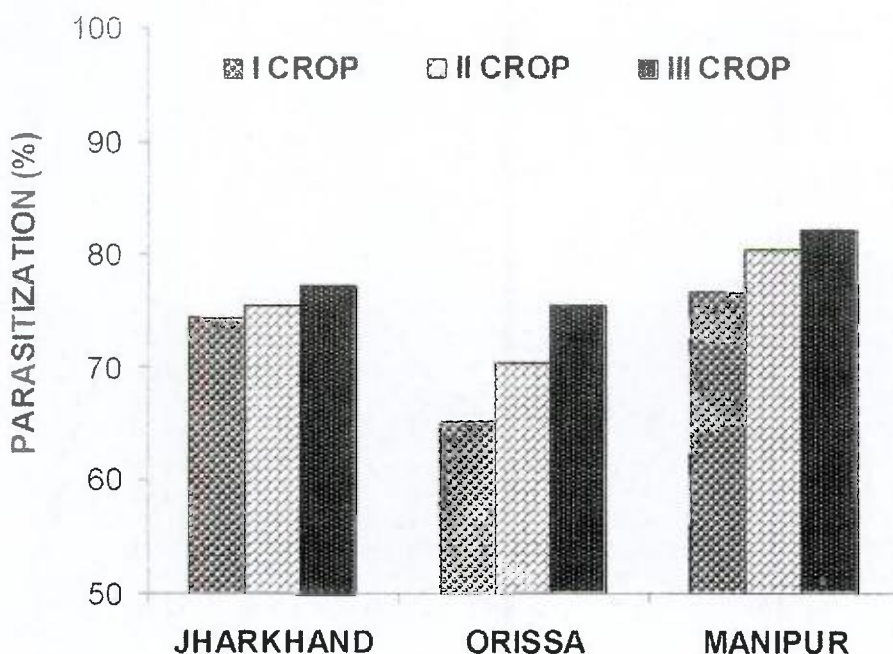


Fig. 1. Parasitization percentage of uzi fly puparia by *Nesolynx thymus* after release in the field.

Fig. 1. Pourcentage de parasitisme des pupes de la mouche uzi après la libération de *Nesolynx thymus* sur le terrain.

Table I. Uzi fly infestation in tassar silkworm after field release of *Nesolynx thymus*.

Tableau I. Infestation du ver à soie tassar par la mouche uzi après la libération sur le terrain de *Nesolynx thymus*.

Locality of parasitoid release	Treatment / Control	Uzi fly infestation (%) in tassar silkworm after release of <i>N. thymus</i>			
		I – Crop	II – Crop	III – Crop	Significant level
		<i>Infestation par la mouche uzi (%) chez le ver à soie après la libération de N. thymus</i>			
<i>Localité de libération du parasitoïde</i>	<i>Traitement / Témoin</i>	<i>Récolte I</i>	<i>Récolte II</i>	<i>Récolte III</i>	<i>Niveau significatif</i>
Jharkhand	Treatment / <i>Traitement</i> Control / <i>Témoin</i>	5.25 13.62	6.20 17.50	6.92 32.38	P < 0.05
Orissa	Treatment / <i>Traitement</i> Control / <i>Témoin</i>	3.12 5.54	3.72 7.80	5.56 15.58	P < 0.05
Manipur	Treatment / <i>Traitement</i> Control / <i>Témoin</i>	6.45 16.50	9.42 29.10	9.90 35.81	P < 0.05

The present study involving the introduction of indigenous natural enemies (parasitoids) in the field as bio-control agent of *B. zebina* demonstrated that the recovery of *N. thymus*, from the host varied during the period of study, which clearly indicated the persisting (surviving) ability of the parasitoids in the area of their release; the parasitisation of host puparia available at different locations of rearing reflected the host searching ability of the released natural enemies under field conditions with high parasitisation of host puparia.

A novel bio-control agent should have the quality of high host searching ability, good reproductive capability relative to the host, good host parasitising ability, higher degree of host specificity or preference, and better synchrony with host life cycle (Embeden, 1974). In the present study it has been observed that multiplication of *N. thymus* (through parasitised puparia) in the available environment was proportionate to the multiplication trend of uzi fly (uzi infestation in silkworm larvae in control area). Such a trend may help in establishing a density dependent regulation of *N. thymus* and uzi fly, *B. zebina* populations.

The survival of *N. thymus* throughout the year, its host searching ability and high parasitisation potential observed in the present study clearly indicate that this parasitoid possesses certain desirable characters of a novel bio-control agent for the control of uzi fly, *B. zebina*. Therefore, the findings clearly indicated that the parasitoid possessed certain desirable characters of a novel bio-control agent to prevent uzi fly. Hence, release of *N. thymus* is recommended for tassar growing fields to control uzi fly.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to Shri S. P. Singh, T. A. and Shri L.B.N. Shahdeo, T. A. for their assistance rendered during the present investigation. Authors are also grateful to Mr. Suresh Rai, Scientist - C (Statistics), for analysis of the experimental data.

REFERENCES

- CHATURVEDI, H. K., SAXENA, V & KHOTALE, V (1986) Survey of uzifly infestation in Baster District. *Indian J. Zool.*, 14(2): 27-32
- EMBEDEN, H. F. VAN (1974) Pest control and its ecology. *Studies in biology* No. 50, Edward, Arnold, London.
- FISHER, R A & YATES, F (1963) Statistical tables for Biological, Agricultural and Medical research. Longman, England, 146p.
- JOLLY, M. S. (1972) A new technique of tasar silkworm rearing, *Indian Silk*, 11(1): 5 - 8.
- JOLLY, M. S., SEN, S. K. & AHSAN, M. M. (1974) *Tasar Culture*, Ambica publishers, Bombay, India, 266p.
- KISHORE, R., BARDAIYAR, B. N., GUPTA, R. & KARNAN, P. (1996) Bionomics and control of uzifly, *Annual report, CTRTI, Ranchi*, India, 48p.
- KISHORE, R., SHARMA, S P, PRASAD, B. C., B. R. R. P. SINHA & THANGAVELU, K (1999) Evaluation of four hymenopteran parasitoids against uzifly, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera : Tachinidae), *Proceedings Seminar on Tropical Sericulture, Bangalore*, 1999:25- 26.
- KISHORE, R., SHARMA, S. P., SHARAN, S. K., SINHA, B. R. R. P. & THANGAVELU, K (2000) IPM approach to optimize tasar silkworm cocoon production. *National Conference of Strategy for Sericulture Research and Development at Mysore, India*, Nov. 16-18, 2000:89 p.
- KISHORE, R., SHARMA, S. P., SHARAN, S. K., SINHADEO, S. N. & THANGAVELU, K (2001) Optimal conditions of host- parasitoid density, ratio and age for the multiplication of *Nesolynx thymus* (Girault), a parasitoid of the uzifly, *Blepharipa zebina* Walker. *Sericologia*, 41(3) : 449-454.
- KISHORE, R., SHARMA, S. P., DEBNATH, A. K., ROY, G. C. & SURYANARAYANA, N (2005) IPM approach to enhance tasar silkworm cocoon production. *Proceedings of Inter. Seri. Commission, Vol. II (Non mulberry Silkworm)*: 48 – 52.
- KUMAR, P., PRASAD, K. S., KISHORE, R., MANJUNATH, D. & DATTA, R. K. (1993) Efficiency of introduced indigenous parasitoids against uzifly, *Exorista sorbillans*. *Recent Adv. Uzifly Res.*, 127-133.
- SINGH, R. N. & THANGAVELU, K. (1991) Parasites and predators of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* and their control measures. *Indian Silk*, 29(12): 33-36.

NESOLYNX THYMUS, UN AGENT DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA MOUCHE UZI, BLEPHARIPA ZEBINA WALKER CHEZ LE VER A SOIE TASAR ANTHERAEA MYLITTA D.

RAM KISHORE*, A. K. DEBNATH & N. SURYANARAYANA

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 835 303 (Inde).

La mouche uzi, *Blepharipa zebina* Walker (Diptère: Tachinidae) est un endoparasitoïde larvaire du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* Drury et du ver à soie du chêne, *A. proylei* Jolly (Lépidoptère : Saturniidae). On a estimé la perte de récolte de vers à soie due à la mouche uzi à 15 à 20 %, ce qui entraîne une diminution de la production et de la productivité. Des efforts ont été entrepris pour lutter contre la mouche uzi de manière biologique. On a recueilli huit parasitoïdes indigènes de la mouche uzi sur le terrain et on les a fait identifier par le Laboratoire de Gestion des Parasites du **Central Tasar Research and Training Institute** de Ranchi. Les études indiquent la supériorité de *Nesolynx thymus* (Girault) (Eulophidae) comme agent de lutte biologique contre la mouche uzi, *B. zebina* par rapport aux autres parasitoïdes.

Bien que plusieurs chercheurs aient étudié les aspects biologiques de *N. thymus* (un parasitoïde nymphal de la mouche uzi), on n'a pas évalué son efficacité au niveau du terrain. Cette étude a été entreprise sur le terrain dans différents états d'élevage du tasar de manière à endiguer l'infestation par la mouche uzi chez le ver à soie tasar. Cette étude a révélé la capacité de recherche de l'hôte de l'ennemi naturel et son potentiel à lutter contre le parasitoïde primaire. Par ailleurs, les résultats mettent aussi en avant l'efficacité de *N. thymus* dans différentes zones agro climatiques du Jharkhand, de l'Orissa et d'Imphal (Manipur).

Les résultats ont montré que *N. thymus* a la capacité à chercher et à parasiter les pupes uzi dans toutes les directions jusqu'à une distance de 65 mètres. Le parasitisme moyen des pupes uzi par *N. thymus* que l'on enregistre est de 75,18 % $\pm$ 8,97. Les résultats indiquent clairement que le parasitoïde possède certains des caractères désirables pour un nouvel agent de lutte biologique pour contrer la mouche uzi. On recommande donc la libération de *N. thymus* dans les champs d'élevage du tasar pour lutter contre la mouche uzi.

INTRODUCTION

La mouche tachinaire, *Blepharipa zebina* Walker (Diptère : Tachinidae) est un endoparasitoïde larvaire du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* Drury et du ver à soie tasar du chêne, *A. proylei* Jolly (Lépidoptère : Saturniidae) (Jolly et coll., 1974 ; Singh et Thangavelu, 1991). On a estimé la perte de récolte provoquée par la mouche uzi entre 15 et 20 % chez le ver à soie, ce qui entraîne une diminution de la production et de la productivité (Jolly et coll., 1974 ; Singh et Thangavelu, 1991). Parfois, les pertes provoquées par cette mouche parasite sont d'environ 40 % dans les zones tropicales du tasar (Chaturvedi et coll., 1986 ; Singh et Thangavelu, 1991). Des efforts ont été faits pour lutter contre la mouche uzi par des moyens biologiques (Kishore et coll., 1996 ; 1999 et 2000 ; Singh et Thangavelu, 1991). On a recueilli huit parasitoïdes indigènes de la mouche uzi à savoir *Nesolynx thymus* (Girault), *Tetratichus howardi* (Olliff.) *Pediobius* sp. (Eulophidae), *Spalangia endius* Walker, *Trichomalopsis*

* Email : rkishor03@yahoo.co.in et ramkishore56@rediffmail.com

apanteloctena (Crawford) (Pteromalidae), *Brachymeria lasus* Walker, *Dirhinus himalayanus* Westwood (Chalcididae) et *Trichopria* sp. (Diapriidae) sur le terrain et ils ont été identifiés par le Laboratoire de Gestion des Parasites du *Central Tassar Research & Training Institute*, de Ranchi (Kishore et coll., 1999 ; Singh et Thangavelu, 1991). Les études indiquent la supériorité de *Nesolynx thymus* (Girault) (Elophidae) comme agent de lutte biologique contre la mouche uzi, *B. zebina*, par rapport aux autres parasitoïdes.

Bien que plusieurs chercheurs aient étudié les aspects biologiques de *N. thymus* (un parasitoïde nymphal de la mouche uzi) (Kishore et coll., 1996 ; 1999 et 2000 ; Singh et Thangavelu, 1991), on n'a pas mesuré son efficacité au niveau du terrain. Cette étude a été entreprise sur le terrain dans différents états d'élevage du tassar de manière à endiguer l'infestation par la mouche uzi chez le ver à soie tassar tempéré et tropical. Cette étude révèle la capacité de recherche de l'hôte de l'ennemi naturel et son potentiel à lutter contre le parasitoïde primaire. Par ailleurs, les résultats mettent aussi en avant l'efficacité de *N. thymus* dans différentes zones agro climatiques de Jharkhand, de l'Orissa et d'Imphal (Manipur). L'évaluation de *N. thymus* (parasitoïde grégaire) en laboratoire, sur la base de sa capacité à chercher et à parasiter les pupes uzi indique son potentiel énorme dans la lutte biologique contre *B. zebina* (Kishore et coll., 1999).

MATERIELS ET METHODES

On a utilisé les races de ver à soie telles qu'*Antheraea mylitta* et *A. proylei* comme animaux tests élevés sur les buissons des plantes hôtes du tassar, en suivant la méthode d'élevage améliorée (Jolly, 1972). La période d'élevage en fonction des récoltes du ver à soie tassar tropical est juin – juillet (Récolte I), août – septembre (Récolte II) et octobre – décembre (Récolte III) et du ver à soie tassar tempéré est mars – avril (Récolte I / récolte du printemps), juin – juillet (Récolte II / récolte de la saison des pluies) et septembre – octobre (Récolte III / récolte d'automne). On multiplie *Nesolynx thymus* en masse dans l'insectarium du Laboratoire d'Entomologie du C.T.R.T.I., de Ranchi en Inde à $25 \pm 2^\circ \text{C}$, $60 \pm 5\%$ HR et une photopériode de 12 h L : 12 h O, en suivant les méthodes mises au point par Kishore et coll., 2001. Pour la libération du parasitoïde, on choisit les champs d'élevage du ver à soie d'Hatgambria et de Kharsawan dans le Jharkhand, de Bangariposi et de Baripada dans l'Orissa et d'Imphal dans le Manipur. On sélectionne un champ d'élevage isolé du ver à soie (dans chaque localité) comme témoin. On libère 100 000 adultes de *N. thymus* pour un champ d'élevage de 100 pontes saines, d'après le calendrier (Kishore et coll., 2005).

Après l'émergence, on alimente les parasitoïdes adultes de *N. thymus* sur une solution aqueuse de miel à 50 % et on les maintient dans un insectarium pendant un jour pour assurer l'accouplement (Kishore et coll., 2001). On maintient cinq répétitions pour le recueil des données dans chaque localité.

Avant la libération du parasitoïde, on établit une base de données sur l'infestation par la mouche uzi à la fois du traitement et du témoin. On enregistre une moyenne d'infestation par la mouche uzi de 15,4 % et 27,14 % respectivement chez le tassar tropical et tempéré. On libère les parasitoïdes en fin de soirée à la fois pendant l'élevage du ver à soie et après la récolte des cocons. Pour étudier le taux d'infestation des pupes de la mouche uzi par les parasitoïdes libérés, on conserve 500 pupes (de deux jours) dans cinq endroits avec 100 pupes par endroit sur une surface d'élevage de 100 pontes saines. On enregistre les observations sur le taux d'infestation des pupes de la mouche uzi par les parasitoïdes pendant toutes les saisons de récolte. On conserve le même nombre de pupes chez le témoin. On analyse les données recueillies statistiquement pour déterminer le niveau de signification (Fisher et Yates, 1963), en suivant une ANOVA à un facteur.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sur le parasitisme des pupes uzi par les parasitoïdes libérés sont présentés dans la Fig. 1. Le pourcentage de parasitisme des pupes uzi par *N. thymus* pendant les récoltes I, II et III après

la libération sont de respectivement 74,26 ; 75,34 et 77,11 % dans la zone d'élevage du tasar de Jharkhand et de 65,10 ; 70,28 et 75,30 dans la zone d'élevage du tasar de l'Orissa et de 76,54 ; 80,36 et 82,20 % dans la zone d'élevage du tasar du chêne du Manipur. Les données révèlent que le pourcentage de parasitisme des pupes de la mouche uzi par les parasitoïdes après la libération pour la première récolte ne s'avère pas significativement différent par comparaison à la libération des parasitoïdes dans différents états d'élevage du tasar. De même, on n'observe pas de différence significative des pourcentages de parasitisme des pupes uzi enregistrés pendant l'élevage des récoltes II et III du ver à soie tasar et l'élevage du ver à soie tasar du chêne (Fig. 1). Les résultats indiquent que pour obtenir le parasitisme maximum des pupes de la mouche uzi, il faut libérer *N. thymus* à intervalles réguliers, pendant toutes les saisons d'élevage des récoltes du ver à soie, pour qu'il s'établisse.

Le pourcentage moyen d'infestation de la mouche uzi sur le ver à soie pendant le traitement pendant les saisons de récoltes I, II et III dans la zone d'élevage du ver à soie tasar de Jharkhand est de respectivement 5,25 ; 6,20 et 6,92 ; dans la zone d'élevage du ver à soie tasar de l'Orissa, il est de 3,12 ; 3,72 ; et de 5,56 et dans la zone d'élevage du ver à soie du tasar de chêne du Manipur, il est de respectivement 6,45 ; 9,42 et 9,90, tandis que chez le témoin, le pourcentage d'infestation par la mouche uzi s'avère être de 13,62 ; 15,70 et 32,38 dans la zone d'élevage de Jharkhand ; de 5,54 ; 7,80 et de 15,58 dans l'élevage de l'Orissa et de 16,50 ; 29,10 et 35,81 dans la zone d'élevage du tasar du chêne de Manipur. Les données révèlent que l'infestation par la mouche uzi dans la zone témoin est significativement plus élevée ($P < 0,05$) par comparaison au traitement pendant les trois saisons de récolte (Tableau I). Kumar et coll (1993) ont signalé que *N. thymus* est très efficace pour parasiter la mouche uzi, les pupes de la mouche uzi *Exorista sorbillans* pendant toute l'année.

La capacité de dispersion est la caractéristique la plus souhaitable d'un ennemi naturel efficace. Quand on libère périodiquement *N. thymus* à différentes distances des champs d'élevage du ver à soie et des centres de grainage, il s'avère que le parasitoïde est capable de se disperser et de chercher les pupes hôtes localisées jusqu'à une distance de 65 m.

Cette étude impliquant l'introduction d'ennemis naturels indigènes (parasitoïdes) sur le terrain comme agent de lutte biologique contre *B. zebina* montre que la récupération de *N. thymus* sur l'hôte varie pendant la période d'étude, ce qui indique clairement la capacité persistante (de survie) des parasitoïdes dans la zone de leur libération ; le parasitisme des pupes hôtes disponibles dans différents lieux d'élevage reflète la capacité de recherche des ennemis naturels libérés, dans des conditions de terrain, avec un parasitisme élevé des pupes hôtes.

Un nouvel agent de lutte biologique doit posséder une capacité élevée de recherche de l'hôte, une bonne capacité de reproduction par rapport à l'hôte, une bonne capacité de parasitisme de l'hôte, un degré supérieur de spécificité ou de préférence de l'hôte et une meilleure synchronisation avec le cycle de vie de l'hôte (Embeden, 1974). Dans cette étude, on a observé que la multiplication de *N. thymus* (par les pupes parasitées) dans l'environnement présent est proportionnelle à la tendance à la multiplication de la mouche uzi (infestation uzi chez les larves de ver à soie dans la zone témoin). Une telle tendance pourrait permettre d'établir une régulation des populations de *N. thymus* et de la mouche uzi, *B. zebina* dépendant de la densité.

La survie de *N. thymus* pendant toute l'année, sa capacité à chercher l'hôte et son potentiel élevé de parasitisme observés dans cette étude, indiquent clairement que ce parasitoïde possède certains des caractères souhaitables chez un nouvel agent de lutte biologique dans la lutte contre la mouche uzi, *B. zebina*. Ces observations indiquent donc clairement que le parasitoïde possède certains des caractères souhaitables d'un nouvel agent de lutte biologique pour contrer la mouche uzi. On recommande donc la libération de *N. thymus* dans les champs d'élevage du tasar pour lutter contre la mouche uzi.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

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

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

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

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

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

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

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

- Remerciements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

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

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

5) The typescript should contain the following features:

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

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

- Acknowledgements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

