

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

Publiée par la Commission Séricicole Internationale
Published by the International Sericultural Commission
26, rue Bellecordière - 69002 Lyon - 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*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
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*)
MASE K. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
MIRANDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
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

Revues / Reviews

Characterization and evaluation of oak tasar silkworm genetic resources in India . . .	1
Caractérisation et évaluation des ressources génétiques du ver à soie tasar du chêne en Inde	13
N. IBOTOMBI SINGH, L. SOMEN SINGH & K. C. SINGH	

Applications of molecular markers in uzi fly (Diptera)	19
Applications des marqueurs moléculaires chez la mouche uzi (Diptère)	25
B. C. KESHAVA MURTHY & H. P. PUTTARAJU	

Spiralling whitefly, <i>Aleurodicus dispersus</i> (Russel) on mulberry and its management practices	29
La mouche blanche à ponte en spirale, <i>Aleurodicus dispersus</i> (Russel) sur le mûrier et les pratiques pour lutter contre elle	37
K. A. MURUGESH	

Rapports techniques / Technical reports

Relative susceptibility of cross breeds of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L. to nuclear polyhedrosis virus and botanical based virus management	45
Sensibilité relative des croisements du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L. au virus de la polyédrose nucléaire et lutte contre le virus à partir de substances botaniques	53
H. V. RAMESH KUMAR, K. A. MURUGESH, C. A. MAHALINGAM, N. CHANDRAMOHAN & P. MOHANRAJ	

Susceptibility status of three popular commercial hybrids of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L. to different species of <i>Aspergillus</i>	57
Sensibilité de trois hybrides commerciaux populaires du ver à soie, <i>Bombyx mori</i> L. à différentes espèces d' <i>Aspergillus</i>	71
S. MANOCHAYA, M. BALAVENKATASUBBAIAH, K. CHANDRASEKHARAN, J. JUSTIN KUMAR & S. D. SHARMA	

Development of new cold storage preservation technology for cross breed (PM × CSR2) eggs of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	77
Mise au point d'une nouvelle technologie de conservation par stockage au froid pour les oeufs hybrides du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L. (PM × CSR2)	87
K. L. RAJANNA, G. VEMANDA REDDY, V. K. HARLAPUR & H. K. BASAVARAJA	

Food utilization efficiency in <i>Antheraea mylitta</i> fed on <i>Terminalia arjuna</i> leaves . . .	91
Efficacité d'utilisation de la nourriture chez <i>Antheraea mylitta</i> nourri sur des feuilles de <i>Terminalia arjuna</i>	101
S. S. RATH	

Induction of tolerance to root rot disease in Indian mulberry varieties through <i>in vitro</i> approaches	107
Induction de la tolérance à la maladie de la pourriture de la racine chez des variétés de mûrier indiennes par des approches <i>in vitro</i>	119
M. MUTHUSWAMI, S. SUBRAMANIAN, R. GANGADHARA, M. BHARATHI & R. GNANAM	

Age-specific fertility life tables of <i>Meteorus spilosomae</i> Narendran and Rema (Hymenoptera: Braconidae), a new parasitoid of <i>Spilosoma obliqua</i> Walker (Lepidoptera: Arctiidae) at different temperature and relative humidity	125
Fertilité spécifique à l'âge chez <i>Meteorus spilosomae</i> Narendran et Rema (Hyménoptère : Braconidae), un nouveau parasitoïde de <i>Spilosoma obliqua</i> Walker (Lépidoptère : Arctiidae) à différentes températures et humidités relatives	131
B. MARIMADAI AH & M. GEETHA BAI	

Damaging threshold level of <i>Macrophomina phaseolina</i> causing charcoal root rot disease in mulberry	135
Niveau seuil des dégâts causés par <i>Macrophomina phaseolina</i> , responsable de la maladie de la pourriture de la racine charbonneuse chez le mûrier	141
N. B. CHOWDARY, D. D. SHARMA, MALA V. R. & S. M. H. QADRI	

CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF OAK TASAR SILKWORM GENETIC RESOURCES IN INDIA

N. IBOTOMBI SINGH*¹, L. SOMEN SINGH AND K.C. SINGH

Regional Tasar Research Station, Central Silk Board, Imphal-795001, India.

¹Central Muga Eri Research and Training Institute, Central Silk Board, Lahdoigarh, Jorhat-785700, India.

The morphological characters of four oak tasar silk moth species viz. *Antheraea roylei*, *A. proylei*, *A. frithi*, *A. pernyi* and four commercially exploited breeds viz. PRP5, PRP12, Blue and C27 conserved in the germplasm bank of Regional Tasar Research Station, Imphal (India) were studied. In cocoon and moth characters *A. roylei* and *A. frithi* differed from the other two species and four breeds while there is not much difference among *A. proylei*, *A. pernyi* and the four breeds except in size and weight. Egg of *A. frithi* is cream yellow and without meconium while the eggs of other genotypes are brown in colour and with meconium. Variations in the colour and weight of the larvae of the different genotypes are recorded. The rearing performances of fourteen oak tasar silkworm genotypes were estimated based on the multiple trait evaluation index (E.I.) method for eight yield contributing traits and superior breeds were identified. The genotype C27 registered highest E.I. values in all the seasons indicating its suitability for rearing in all the seasons. *A. frithi* which exhibited individual highest E.I. values in the effective rate of rearing and cocoon yield during summer crop found that it is tolerant to high temperature and humidity and is suitable for summer/autumn rearing.

Keywords: Oak tasar silkworm, characterization, evaluation index.

INTRODUCTION

China and India are the two major countries producing Oak tasar raw silk in the global context. *Antheraea pernyi* Guerin Menevelli and *Antheraea proylei* Jolly are the two species mainly producing oak tasar silk. In India, *A. roylei* Moore and *A. frithi* Moore, are also conserved in the germplasm bank along with some evolved lines for utilization in the breeding and production of tasar silk of commerce. The silkworm feeds on the foliages of *Quercus acutissima*, *Q. griffithii*, *Q. floribunda*, *Q. leucotrichophora*, *Lithocarpus dealbata*, etc. The rearing of the young age instars is done in indoor and from third instar till spinning the rearing is done outdoor. In India, oak tasar culture plays an important role in the economic uplifting of the weaker section of the society who are inhabiting in the oak belt of the sub-Himalayan region extending to Manipur, Nagaland, Assam, Mizoram, Meghalaya and Arunachal Pradesh in the North-East and Jammu Kashmir, Himachal Pradesh and Uttarakhand in the North-Western region of Himalaya. The spring crop rearing starts from the first/second week of March and after 35-45 days of feeding the larvae spin the cocoons. Being reared outdoor, it is prone to various diseases, pest and predators resulting in large mortality. The spring crop is the main seed or commercial crop and thereafter 75-85% of the pupae undergo diapause for 7-8 months. In North East India, commercial rearing is restricted to spring season only. Additional crops are taken up on small scale during summer or autumn by breaking the pupal diapause through

* author for correspondence, E-mail: ibotombisingh@yahoo.co.in

photoperiodic treatment of the pupae for 16-17 hours per day for 18-25 days. However, farmers are not interested to take up oak tasar silkworm rearing during summer and autumn crops due to the low harvest during these seasons. However, summer/autumn crop rearing is practically feasible and essential to increase the economic benefit of the culture in the region. Thus it is necessary to identify the season specific species/breeds. Studies on the season wise performance of the four species and ten lines conserved in the germplasm bank of the Regional Tasar Research Station, Imphal (India) needs to be conducted. Systematic characterization of the oak fed *Antheraea* species and breeds available in this region is needed so as to make it as a ready reference to the breeders for proper utilization in conducting systematic breeding research to improve the economic characters.

In sericulture, many traits are considered important in increasing silk yield and each trait contributes to different degrees to increase silk yield. All the yield contributing traits are rarely superior in a single breed. Thus, it is necessary to identify the superior breeds and hybrids based on cumulative effect of various traits. Several methods are employed for simultaneous evaluation of multiple traits to identify the superior genotypes (Arunachalam and Bandyopadhyay, 1984; Grower, 1971; Kalpana *et al.*, 1998; Mano *et al.*, 1993). Among the various evaluation methods used in silkworms, Multiple Trait Evaluation Index (E.I.) method of Mano *et al.*, (1993) has been extensively used for selection of superior breeds and hybrids (Harjeet Singh and Suresh Kumar, 2008; Kariappa and Rajan, 2005; Naseema Begum *et al.*, 2000; Nazia Choudhary and Ravindra Singh 2006; Rajlakshmi *et al.*, 2000; Ramesh Babu *et al.*, 2002; 2005; Ravindra Singh *et al.*, 2001; Singh and Subha Rao, 1998; Sudhakara Rao *et al.*, 2001). In the present paper, the different characteristic features of the genetic resources of oak tasar silkworms and superior genotypes suitable for spring and summer/autumn crops are reported.

MATERIALS AND METHODS:

Four *Antheraea* species viz. *Antheraea proylei* Jolly, *Antheraea pernyi* Guerin Menevelli, *Antheraea roylei* Moore and *Antheraea frithi* Moore and ten breeds viz. PRP₂, PRP₃, PRP₅, PRP₁₂, RPP₄, Blue, C₂₇, Yellow, Blue₆ and BlueYellow₁ are collected from the germplasm bank of the Regional Tasar Research Station, Imphal (India) and utilized in the present study. Among the ten breeds Blue₆ and Blue Yellow₁ were received from China during the year 1998 while the remaining eight lines are isolated at this Research station. The four species *Antheraea proylei*, *Antheraea pernyi*, *Antheraea roylei* and *Antheraea frithi* and the four commercially exploited isolated lines viz. PRP₅, PRP₁₂, Blue and C₂₇ are characterized morphologically at the different developmental stages. Rearing of young age worms of all the genotypes is conducted indoor and from 3rd instar onwards the rearing is conducted outdoor in Imphal, India (785 m above MSL; 93.94°E longitude and 24.83°N latitude). Rearing of *A. proylei*, *A. pernyi* and ten breeds is conducted on *Q. acutissima* foliages while *A. roylei* and *A. frithi* are reared on *Lithocarpus dealbata* foliages during both spring and summer/autumn seasons.

For computation, the yield contributing parameters viz. fecundity, hatching%, effective rate of rearing (ERR %), cocoon per disease free laying (dfl), single cocoon weight, cocoon shell weight, shell ratio (SR %) and filament length are recorded. The ranking of the different species and breeds are worked out by following the multiple trait evaluation index method of Mano *et al.* (1992,1993) which is outlined as follows-

$$\text{Evaluation Index (EI)} = \frac{A - B}{C} \times 10 + 50$$

where,

A=individual value of the genotype

B = average value of the particular trait of the genotypes,

C = standard deviation of the particular trait,

10 = standard unit,

50 = fixed value.

Evaluation index values for individual characters for each genotype were calculated and average cumulative index value of the eight characters under study was obtained. The genotype which recorded average index values of > 50 was considered for selection and the genotypes which recorded average index value of < 50 were considered inferior.

RESULTS AND DISCUSSION:

Morphological Characterization:

Various morphological and quantitative characters of four *Antheraea* species viz., *Antheraea proylei* (n=49), *Antheraea pernyi* (n=49), *Antheraea roylei* (n=31) and *Antheraea frithi* (n=31) and four commercially exploited breeds viz. PRP5, PRP12, Blue and C27 are presented in Table I.

In cocoon colour and shape, there is no significant difference between *A. pernyi*, *A. proylei* and other eight breeds. *A. roylei* is unique in having white colour double layered cocoons of which the outer shell is not reelable and only the inner shell is reelable. Cocoons of *A. frithi* are harder and compact with less floss. Variations in cocoon weight, cocoon shell weight, Cocoon shell ratio, reelability, filament length, denier and length of peduncle were recorded in all the genotypes.

Weight of female pupa was higher than the male pupa and variation in the weight of male and female pupae were recorded in all the genotypes. C27 registered the highest weight in male (4.99-6.64g) and female pupa (6.02-10.40g) and *A. frithi* registered the lowest weight in male (2.5-4.5g) and female pupa (3.6-6.3g). Variations in the wing span and area were observed in both male and female moths of all the genotypes with the highest recording in C27. In *A. frithi*, variation in the morphological colour of moths was observed. The male moth is either greenish yellow or brick red while the female moth is either yellow, light brown or greenish brown. The eggs of all the genotypes are elliptical in shape, brown in colour and with meconium except in *A. frithi* whose eggs are creamish yellow in colour and without meconium.

There are variations in the colour of the mature larvae of the different genotypes ranging from dark green to blue. In *A. frithi*, the colour of the larvae varies from light green to bluish green. In *A. roylei* also variations in the larval colour have been observed while in moths the colour varies from greenish grey in male to reddish brown in female.

A. proylei, *A. pernyi* and the other ten breeds behave as weak bivoltines at the latitude between 22°N to 35°N while *A. roylei* and *A. frithi* are purely bivoltine within the same latitude range. After cocooning, the silkworm undergoes diapause at the pupal stage. Normally only one crop is reared during March-April in the North-east region of India from the natural emergence of moths. However, summer and autumn rearing are conducted by breaking the pupal diapause through 16 to 17 hours of photoperiodic treatment at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and R.H.65 to 80% for 20 to 25 days.

Rearing and Yield Evaluation:

The evaluation index values of the fourteen genotypes in eight important yield contributing characters during spring and summer/autumn crops are shown in Tables II, III & IV respectively. Results revealed that none of the genotypes was superior to that of the check genotype *A. proylei* in all the characters during the three seasons. Each genotype was superior in certain characters only. Similar observation has been reported in mulberry silkworm (Asma Maqbool *et al.*, 2005).

During spring crop, nine genotypes showed average evaluation index values of > 50 (50.11 to 59.45) as shown in Table III.

Table I. Characteristic features of the different oak tasar silkworm genotypes.

Tableau I. Caractéristiques des différents génotypes du ver à soie tasar du chêne.

Characters	Name of Genotypes / Nom des génotypes							
Caractères	<i>A. roylei</i>	<i>A. proylei</i>	<i>A. frithi</i>	<i>A. pernyi</i>	PRP ₅	PRP ₁₂	Blue	C27
Cocoons / Cocons								
Shape / Forme	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval
Wrinkle / Rides	Loose <i>Laches</i>	Medium <i>Moyennes</i>	Fine to medium <i>Fines à moyennes</i>	Medium <i>Moyennes</i>	Medium <i>Moyennes</i>	Medium <i>Moyennes</i>	Medium <i>Moyennes</i>	Medium <i>Moyennes</i>
Weight / Poids								
Male (g) / Mâle (g)	4.0-6.4	4.91-6.37	3.0-4.8	4.8-6.99	4.24-6.13	4.11-6.54	5.10-6.36	5.78-6.40
Female (g) / Femelle (g)	6.1-9.9	4.84-7.29	5.2-7.1	6.03-7.89	5.51-7.83	5.85-8.53	6.20-9.60	6.78-11.61
Shell weight / Poids de la coque								
Male (g) / Mâle (g)	0.5-0.7	0.60-0.97	0.30-0.51	0.47-0.87	0.40-0.77	0.43-0.99	0.54-0.76	0.66-0.78
Female (g) / Femelle (g)	0.7-1.0	0.38-0.81	0.34-0.67	0.48-0.95	0.45-0.79	0.49-0.86	0.58-1.06	0.66-1.21
Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)								
Male (%) / Mâle (%)	12-13	11-15	07-14	9.77-13.36	10.97-12.99	9.04-13.14	10.00-12.06	11.45-13.49
Female (%) / Femelle (%)	10-11	08-11	07-12	7.46-10.87	09.02-11.56	7.76-10.69	9.00-12.00	9.48-10.65
Length (cm) / Longueur (cm)	4.4-5.4	2.1-2.5	3.2-4.1	3.7-4.9	3.7-4.4	3.5-4.6	4.00-5.00	4.5-5.5
Breadth (cm) / Largeur (cm)	3.2-4.3	2.1-2.5	1.6-2.1	2.1-2.7	2.1-2.6	2.1-2.7	2.20-3.00	2.0-2.5
Peduncle length (cm) Longueur du pédoncule (cm)	3.2-5.4	3.5-9.9	2.0-7.5	1.6-8.8	1.4-6.6	1.4-7.1	4-10	4.5-9.8
Boil-off loss (%) / Perte au décreusage (%)	17-20	18-22	14-19	17-21	14-16	16-18	18-22	15-17
Raw silk % / % de soie grège	06-09	40-45	39-44	58-64	60-66	71-75	40-50	71-75
Filament length (m) Longueur du filament (m)	180-204	550-650	550-600	761-850	655-695	720-790	600-850	650-840
Denier / Titre	5.7-6.3	5.0-5.5	3.5-4.00	5.0-5.5	5.2-5.4	5.8-6.5	4.5-5.5	4.5-5.5
Reelability (%) / Dévidabilité (%)	16-25	48-65	50-55	40-65	55-60	60-70	55-60	60-65

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

	<i>A. roylei</i>	<i>A. proylei</i>	<i>A. frithi</i>	<i>A. pernyi</i>	PRP ₅	PRP ₁₂	Blue	C27
Diagnostic features of cocoons	White in colour, double layered with peduncle	Robust compact and hard with peduncle and ring	Compact, less flossy, peduncle long with ring	Single shell, light brown, oval, soft, slightly fibrous reelable	Compact, less flossy, peduncle long with ring and brown in colour	Compact, less flossy, peduncle long with ring and brown in colour	Compact, less flossy, peduncle long with ring and brown in colour	Compact, less flossy, peduncle long with ring and brown in colour
Caractères principaux des cocons	De couleur blanche, à double couche, avec un pédoncule	Robuste, compact et dur avec un pédoncule et un anneau	Compact, moins de bourre de soie, avec une longueur de pédoncule et un anneau	Une seule coque, marron clair ovale, doux, légèrement fibreux, dévidable	Compact moins de bourre de soie, avec une longueur de pédoncule et un anneau et de couleur marron	Compact, moins de bourre de soie, avec une longueur de pédoncule et un anneau et de couleur marron	Compact moins de bourre de soie, avec une longueur de pédoncule et un anneau et de couleur marron	Compact, moins de bourre de soie, avec une longueur de pédoncule et un anneau et de couleur marron.
Pupa / Chrysalide								
Colour / Couleur	Light metallic / Clair métallisé	Light metallic / Clair métallisé	Red metallic / Rouge métallisé	Black metallic / Noir métallisé	Metallic / Métallisé	Metallic / Métallisé	Light-Metallic / Clair métallisé	Metallic / Métallisé
Weight (g) / Poids (g)								
Male / Mâle	4.5-5.3	4.1-4.8	3.5-4.5	4.40-6.14	3.6-5.32	3.96-6.56	4.5-5.5	4.99-6.64
Female / Femelle	7.0-9.3	4.4-6.4	3.6-6.3	5.37-8.50	4.02-6.62	4.64-8.17	5.00-8.50	6.02-10.40
Moth / Papillon								
Duration of emergence / Durée de l'émergence	30-35	30-35	25-30	25-30	30-35	30-35	15-25	30-35
Colour / Couleur								
Male / Mâle	Greenish grey / Gris verdâtre	Greenish brown / Marron verdâtre	Greenish yellow / Jaune verdâtre	Camel brown / Marron fauve	Greenish brown / Marron verdâtre	Greenish brown / Marron verdâtre	Greenish brown / Marron verdâtre	Greenish brown / Marron verdâtre
Female / Femelle	Reddish brown / Marron rougeâtre	Greenish brown / Marron verdâtre	Yellow / Jaune	Camel brown / Marron fauve	Brown / Marron	Light brown / Marron clair	Greenish brown / Marron verdâtre	Brown / Marron

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

Characters <i>Caractères</i>	Name of Genotypes / <i>Nom des génotypes</i>							
	<i>A. roylei</i>	<i>A. proylei</i>	<i>A. frithi</i>	<i>A. pernyi</i>	PRP ₅	PRP ₁₂	Blue	C27
Wing span (mm) <i>Envergure des ailes (mm)</i>								
Male / <i>Mâle</i>	125-154	129-145	128-147	123-137	121-135	115-138	130-150	144-154
Female / <i>Femelle</i>	138-165	148-161	132-157	139-146	129-144	124-147	150-160	188-197
Fore wing area (mm ²) <i>Surface de l'aile avant (mm²)</i>								
Male / <i>Mâle</i>	1384-1424	1330-1430	1159-1226	1121-1142	1317-1357	1196-1216	1214-1400	1414-1540
Female / <i>Femelle</i>	1476-1519	1508-1625	1596-1662	1342-1401	1487-1527	1417-1427	1530-1860	1381-1971
Hind wing area (mm ²) <i>Surface de l'aile postérieure (mm²)</i>								
Male / <i>Mâle</i>	1022-1052	1122-1238	931-952	813-950	1107-1147	991-1011	934-1210	1226-1246
Female / <i>Femelle</i>	1033-1087	1381-1495	1245-1295	1040-1075	1242-1282	1161-1427	1148-1458	1520-1573
Fore ocelli Area (mm ²) <i>Surface de l'ocelle avant (mm²)</i>								
Male / <i>Mâle</i>	27-36	36-45	28-40	27.49-37.71	25.94-35.90	31.55-37.72	30-35	30.50-35
Female / <i>Femelle</i>	36-43	45-56	76-84	35.90-56.09	34.12-56.09	35.9-47.77	40-55	40-50
Hind ocelli area (mm ²) <i>Surface de l'ocelle arrière (mm²)</i>								
Male / <i>Mâle</i>	27-39	36-45	20-29	23.17-35.9	25.94-35.90	31.55-45.44	30-35	43.5-15.5
Female / <i>Femelle</i>	47-56	45-56	46-51	45.44-58.35	34.12-56.09	45.44-56.09	40-55	40.33-50.38
Fecundity / <i>Fécondité</i>	190-240	140-180	205-245	142-225	155-215	155-260	160-270	155-310
Egg / <i>Oeuf</i>								
Colour <i>Couleur</i>	Brown <i>Marron</i>	Brown <i>Marron</i>	Creamish yellow <i>Jaune crème</i>	Brown <i>Marron</i>	Brown <i>Marron</i>	Brown <i>Marron</i>	Brown <i>Marron</i>	Brown <i>Marron</i>
Shape <i>Forme</i>	Oval <i>Ovale</i>	Oval <i>Ovale</i>	Oval <i>Ovale</i>	Oval <i>Ovale</i>	Oval <i>Ovale</i>	Oval <i>Ovale</i>	Oval <i>Ovale</i>	Oval <i>Ovale</i>
Weight (mg) / <i>Poids (mg)</i>	0.8-0.9	0.7-0.9	0.7-0.8	0.6-0.8	0.8-0.9	0.7-0.8	0.7-0.8	0.7-0.8
Size (mm) / <i>Taille (mm)</i>	2.8 × 2.3	2.8 × 2.3	2.6 × 2.0	2.6 × 2.1	2.7 × 2.1	2.8 × 2.2	2.9 × 2.2	2.8 × 2.2

Table 1 (Continued....) / Tableau 1. (Suite...).

Characters Caractères	Name of Genotypes / Nom des génotypes							
	<i>A. roylei</i>	<i>A. proylei</i>	<i>A. frithi</i>	<i>A. pernyi</i>	PRP ₅	PRP ₁₂	Blue	C27
Larval characters / Caractères larvaires								
Larval marking / Marquage larvaire	Plain <i>Unie</i>	Plain <i>Unie</i>	Plain <i>Unie</i>	Plain <i>Unie</i>	Plain <i>Unie</i>	Plain <i>Unie</i>	Plain <i>Unie</i>	Plain <i>Unie</i>
Larval colour / Couleur de la larve	Dark green <i>Vert foncé</i>	Light green <i>Vert clair</i>	Light green <i>Vert clair</i>	Green <i>Vert</i>	Light yellow <i>Jaune clair</i>	Light green <i>Vert clair</i>	Blue <i>Bleu</i>	Yellowish green <i>Vert jaunâtre</i>
Vth instar larval duration (Days) <i>Durée du 5ème âge larvaire (jours)</i>	12-15	12-15	8-12	15-17	10-13	12-15	12-15	12-16
Total larval duration (Days) <i>Durée larvaire totale (jours)</i>	35-40	35-40	30-36	35-40	33-40	32-37	32-42	35-40
Tubercular setae / Soies à tubercule								
Structure	Elongated <i>Allongées</i>	Elongated with KN <i>Allongées avec KN</i>	Elongated and pointed <i>Allongées et pointues</i>	Elongated with knob and some are spine like <i>Allongées avec des noeuds et certaines sont comme des épines</i>	Hair like with knob and some are spine like <i>Comme des poils, avec des noeuds et certaines sont comme des épines</i>	Hair like with knob and some are spine like <i>Comme des poils, avec des noeuds et certaines sont comme des épines</i>	Elongated <i>Allongées</i>	Hair like with knob and some are spine like <i>Comme des poils, avec des noeuds et certaines sont comme des épines</i>
Number / Nombre	462	462	506	462	462	462	603	557
Arrangements <i>Disposition</i>	Irregular <i>Irrégulière</i>	Irregular <i>Irrégulière</i>	Irregular <i>Irrégulière</i>	Irregular <i>Irrégulière</i>	Irregular <i>Irrégulière</i>	Irregular <i>Irrégulière</i>	Irregular <i>Irrégulière</i>	Irregular <i>Irrégulière</i>
Weight of mature larva (g) <i>Poids de la larve mûre (g)</i>								
Male / Mâle	12.40-16.64	12.47-16.56	9.00-12.48	12.48-18.17	12.32-15.94	12.68-17.00	13.26-16.36	13.67-16.53
Female / Femelle	15.86-25.75	12.58-18.95	10.80-16.86	15.67-20.50	14.32-20.35	15.18-22.17	16.12-24.96	16.64-28.88

Table II. Evaluation indices for eight traits of oak tasar silkworm genotypes during spring crop.

Tableau II. Indices d'évaluation pour huit caractères chez les génotypes du ver à soie tasar pendant la récolte de printemps.

Name of spp/ Breed	Fecundity	Hatching %	Cocoons/ Dfl	E.R.R. %	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Silk ratio %	Filament length (m)	Average E.I.
Nom de l'espèce / de la lignée	Fécondité	% d'éclosion	Cocons / ponte saine		Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	E. I. moyen
<i>A. proylei</i>	44.72	55.63	46.51	48.35	40.40	36.00	43.62	47.45	45.33
<i>A. pernyi</i>	39.97	53.65	40.41	43.49	40.00	28.00	35.21	46.14	40.88
<i>A. frithi</i>	73.74#	33.96	45.64	35.71	21.40	36.00	73.18#	46.14	46.78
<i>A. roylii</i>	63.19	38.21	19.48	22.10	57.20	50.00	32.75	17.63	37.57
PRP2	37.86	62.19	53.74	53.78	50.00	46.00	48.98	49.21	50.18
PRP3	39.44	52.50	50.00	53.48	64.00#	64.00#	60.72	58.86	54.03
PRP5	52.68	45.82	54.36	53.29	52.40	48.00	43.33	50.53	50.11
PRP12	55.27	61.22	56.97	48.67	56.60	62.00	50.42	56.22	55.92
RPP4	52.68	44.30	53.48	53.75	48.40	44.00	43.48	49.96	48.75
Blue	42.08	41.13	54.36	62.16	56.60	58.00	50.87	56.22	52.68
Blue-6	52.65	54.51	51.74	47.93	53.20	56.00	52.75	54.91	52.96
Blue-Yellow	50.00	57.58	54.36	50.08	56.40	56.00	47.82	55.35	53.45
C27	57.97	65.98#	63.95#	51.03	58.40	64.00#	54.20	60.17#	59.45*
Yellow	39.97	34.33	54.36	68.01#	49.20	50.00	58.98	51.84	50.83

Highest value of the trait / Valeur la plus élevée pour le caractère.

* Highest evaluation index value / Valeur la plus élevée pour l'indice d'évaluation.

ERR: Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage.

E. I.: Evaluation index / Indice d'évaluation.

Table III. Evaluation indices for eight traits of oak tasar silkworm genotypes during summer crop.

Tableau III. Indices d'évaluation pour huit caractères chez les génotypes du ver à soie tasar pendant la récolte d'été.

Name of spp/ Breed	Fecundity	Hatching %	Cocoons/ Dfl	E.R.R. %	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Silk ratio %	Filament length (m)	Average E.I.
Nom de l'espèce / de la lignée	Fécondité	% d'éclosion	Cocons / ponte saine		Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	E. I. moyen
<i>A. proylei</i>	35.26	43.36	48.31	43.49	47.35	46.66	49.57	50.26	45.53
<i>A. pernyi</i>	42.49	38.25	47.47	44.55	46.62	45.00	47.87	49.39	45.20
<i>A. frithi</i>	51.15	59.58#	84.75#	81.66#	47.23	30.00	65.32#	53.28	59.25
<i>A. roylei</i>	45.38	42.89	45.99	44.55	54.70	38.33	17.66	17.88	38.42
PRP2	36.70	51.40	43.80	41.36	40.00	38.33	50.00	45.51	43.37
PRP3	43.93	40.48	46.70	44.55	45.88	45.00	49.57	49.39	45.69
PRP5	45.37	56.40	46.12	44.55	54.70	55.00	48.93	51.98	50.38
PRP12	45.37	37.29	50.85	47.73	53.97	58.33	55.53	54.57	50.45
RPP4	58.38	59.58#	46.72	49.85	53.70	63.33	55.32	53.71	55.07
Blue	61.27	43.36	52.73	55.15	60.58	63.33	51.70	57.16	55.66
Blue-6	55.49	43.36	45.99	47.73	56.17	58.33	51.91	55.00	52.37
Blue-Yellow	59.82	51.46	42.50	44.55	54.70	55.00	48.93	54.57	51.44
C27	66.17#	55.51	50.35	58.33	62.79#	68.33#	55.74	59.32#	62.00*
Yellow	48.24	50.03	48.31	47.73	48.08	48.33	51.06	50.26	49.05

Highest index value for the trait / Valeur de l'indice la plus élevée pour le caractère.

* Highest evaluation index value. / Valeur de l'indice d'évaluation la plus élevée.

ERR: Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage.

Table IV. Evaluation indices for eight traits of oak tasar silkworm genotypes during autumn crop.

Tableau IV. Indices d'évaluation pour huit caractères chez les génotypes du ver à soie tasar pendant la récolte d'automne.

Name of spp/ Breed	Fecundity	Hatching %	Cocoons/ Dfl	E.R.R. %	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Silk ratio %	Filament length (m)	Average E.I.
Nom de l'espèce / de la lignée	Fécondité	% d'éclosion	Cocons / ponte saine		Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	E. I. moyen
<i>A. proylei</i>	36.66	48.08	42.12	45.62	50.00	46.66	42.82	41.73	44.33
<i>A. pernyi</i>	38.11	33.16	43.36	49.20	48.76	45.00	42.82	38.55	42.37
<i>A. frithi</i>	56.96	60.49	77.89#	80.96#	20.76	28.33	82.17#	51.27	57.35
PRP2	35.21	53.68	40.90	44.86	45.38	43.33	46.52	36.96	43.35
PRP3	41.00	60.49	43.36	44.83	47.69	46.66	48.04	40.14	48.52
PRP5	48.26	45.19	45.83	45.68	51.54	50.00	46.08	54.45	48.37
PRP12	47.39	42.89	48.29	50.16	54.61	53.33	45.86	56.04	49.82
RPP4	52.61	48.03	45.83	43.18	50.00	50.00	49.56	48.09	48.41
Blue	59.86	34.26	54.46	52.44	55.38	56.66	50.65	56.04	52.46
Blue-6	55.51	45.13	50.76	48.68	60.76#	60.00	45.65	60.81	53.41
Blue-Yellow	58.41	53.66	45.83	40.22	56.15	56.66	52.17	56.04	52.38
C27	70.01#	64.37#	60.62	51.15	60.76#	66.66#	52.82	70.35#	62.09*
Yellow	46.81	60.37	50.76	52.55	48.36	46.66	46.30	41.73	49.20

Highest value of the trait / Valeur la plus élevée pour le caractère.

* Highest evaluation index value / Valeur la plus élevée pour l'indice d'évaluation.

ERR: Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage.

The breed C27 which recorded highest average E.I. value of 59.45 and individual evaluation index values of > 50 in all the eight characters was rated as the best breed followed by PRP12 with average E.I. value of 55.92 and individual E.I. values of > 50 in seven characters registering highest values in four characters. Three breeds viz. PRP3, PRP12 and Blue Yellow-1 exhibited individual E.I. values of > 50 in seven characters and average E.I. values of > 50 each. The two genotypes Blue-6 and Blue exhibited average E.I. values of > 50 and individual E.I. values of > 50 in 6 six characters each. These genotypes possessing higher E.I. values can be utilized for commercial cocoon production.

It is observed from Table III that during summer crop, eight genotypes registered average E.I. values of > 50 (50.38 to 62.00). The breed C27 which recorded highest average E. I. values of 62.00 and individual E.I. values of > 50 in all the eight characters was rated as the best breed. *Antheraea frithi* ranked second by exhibiting average E.I. value of 59.25 and registered highest individual values in four important economic characters viz, hatching, average cocoon yield, effective rate of rearing (E.R.R.) and cocoon shell ratio. The breed Blue which registered average E.I. value of 55.66 and individual E.I. values of > 50 in seven characters was judged the third best breed. These three genotypes can be exploited for commercial cocoon production during summer crop.

During autumn crop, five genotypes exhibited average E.I. values of > 50 (Table IV). C27 registered the highest average E.I. value of 62.09 and individual E.I. values of > 50 in all the eight characters indicating its superiority to other genotypes. *Antheraea frithi* showed average E.I. value of 57.35 and highest individual E.I. values in three characters. The genotypes Blue, Blue Yellow 1 and Blue-6 displayed individual E.I. values of > 50 in seven, six and five characters respectively. Thus, it is observed that these genotypes may be utilized for production of tasar commercial silk during autumn crop. The highest E.I. values in cocoon productivity and E.R.R. of *A. frithi* during summer and autumn crops show that this genotype is tolerant to high temperature (30°C-35°C) and high humidity (80-95%) and therefore it may be utilized for commercial rearing during these seasons.

In silkworms, many traits are considered economically important since each of them contributes in silk yield at different degrees. Thus, it will be fair to make a decision jointly in selecting the promising breeds/hybrids based on a number of important yield contributing characters by a common index giving equal weightage to all the characters (Mano *et al.*, 1993; Bhargava *et al.*, 1993, 1994; Rajalakshmi *et al.*, 2000; Narayanaswami *et al.*, 2002; Neog *et al.* 2008). Silkworm breeders applied several statistical methods to evaluate the breeding resource material among which the joint scoring method based on dependant characters (Arunachalam and Bandyopadhyay, 1984) and multiple trait evaluation method (Mano *et al.*, 1992) have been widely adopted as the superiority of the genotypes is judged by the phenotypic manifestation of many traits. In the present study C27 exhibited superiority to other genotypes in all the seasons which shows that this genotype can be exploited for commercial cocoon production in all the seasons. The genotypes which manifested average E.I. values of > 50 may be utilized in future breeding programmes for evolution of high yielding breeds and hybrids.

REFERENCES

- ARUNACHALAM, V. & BANDOPADHYAY, A. (1984) A method to make decisions jointly on a number of characters. *Indian J. Genet.* 44(3): 419-424.
- ASMA MAQBOOL; MALIK, G.N.; DAR, H.U.; AFIFA; KAMILI, S. & GUL ZAFFAR (2005) Evaluation of some bivoltine silkworm genotypes under different seasons. *Indian J. Seric*, 44(2): 147-155.
- BHARGAVA, S.K.; THIAGARAJAN, V. & MAJUMDAR, M.K. (1993) Impact of silkworm hybrids on reeling parameters. *The Indian Textile Journal*, 104(3): 66-69.
- BHARGAVA, S.K.; RAJALAKSHMI, E. & THIAGARAJAN, V. (1994) An evaluation index for silk yield contributing traits in *Bombyx mori* (L). *Indian Textile Journal*, 105(11): 83-84.

- GROWER, J.C. (1991) Statistical methods of comparing different multivariate analysis of the same data. In: Mathematics in the Archaeological and Historical Sciences, F.R. Hodson, D.G. Kendall and P. Tautu (Eds.) Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 138-149.
- HARJEET SINGH & SURESH KUMAR, N. (2008) Selection of breeding resource material of bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. for breeding high temperature tolerance. Indian J. Seric. 47(1):20-28.
- KALPANA, G.V.; SUDHAKAR, RAO, P.; GIRIDHAR KSHAMA; ASHAN, M.M. & DATTA, R.K. (1999) Identification of promising bivoltine hybrids by Maize Selection Tool (MST)-A software package. Uttar Pradesh J. Zool., 19: 25-29.
- KARIAPPA, B.K. & RAJAN, R.K. (2005). Selection potential of multivoltine parents of silkworm, *Bombyx mori* L through multiple traits evaluation index method. J. Exp. Zool. India, 8(2): 261-268.
- MANO, Y.; NIRMAL KUMAR, S.; BASAVARAJA, H.K.; MAL REDDY, N. & DATTA, R.K. (1992) An index for multiple trait selection for silk yield improvement in *Bombyx mori* L. Nat. Conf. Mulb. Seric. Res.. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, Dec, 1992, p.116.
- MANO, Y.; NIRMAL KUMAR, S.; BASAVARAJA, H.K.; MAL REDDY, N. & DATTA, R.K. (1993) A new method to select promising silkworm breeds/combinations. Indian Silk, 31:53.
- NASEEMA BEGUM, A.; BASVARAJA, H.K.; SUDHAKAR RAO, P.; REKHA, M. & ASHAN M.M. (2000) Identification of bivoltine silkworm hybrids suitable for tropical climate. Indian J. Seric., 39(1):24-29.
- NAZIA CHOUDHOURI & RAVINDRA SINGH (2006). Evaluation of a few polyvoltine x bivoltine hybrids of silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 5(1): 62-65.
- NARAYANASWAMI, T. K.; ANANTHANARAYANA, S.R. & GOVINDA, R. (2002) Studies on heterosis expression among selected multivoltine x bivoltine crosses of silkworm (*Bombyx mori* L.). Bull. Indian Acad. Seric. 6(10): 72-73.
- NEOG, K.; CHAKRAVORTY, R.; DEKA, G.M. & ZAMAL, T. (2008) Morphological characterization and rearing performance of muga silkworm *Anthereae assamensis* Helfer germplasm accessions. Sericologia 48(3):301-310
- RAJALAKSHMI, E.; CHAUHAN, T.P.S.; KAMBLE, C.K.; SRINIVAS, B.T. & MAHADEVIAH, B.M. (2000) Evaluation of newly evolved bivoltine hybrids of *Bombyx mori* L. for silk yield contributing traits under hill condition. Indian J. Seric. 39(1): 21-23.
- RAMESH BABU, M., CHANDRASHEKHARAIH; LAKSHMI, H. & PRASAD, J. (2002). Multiple trait evaluation of bivoltine hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L. Int. J. Indust. Entomol., 5(1): 37-44.
- RAMESH BABU, M.; LAKSHMI, H.; PRASAD, J.; SHEETHA RAMULU, J.; CHANDRASHEKHARAIH & GOEL A. K. (2005). Evaluation and selection of potential bivoltine parents for silkworm (*Bombyx mori* L.) breeding. Indian J. Seric. 44(1):82-91.
- RAVINDRA SINGH; RACHANA GOEL; RAGHAVENDRA RAO, D.; REKHA, M.; PREMLATHA, V.; ASHAN, M.M. & DUTTA, R.K. (2001) Evaluation of some multivoltine x bivoltine hybrids of the mulberry silkworm *Bombyx mori* L. in two different seasons. Sericologia, 41(2): 231-238.
- SINGH, T. AND SUBHA RAO, G. (1998). Multiple trait evaluation index to select useful silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrid genotypes. Ital. Entomol., 6:379-382.
- SUDHAKAR RAO, P., RAVINDRA SINGH, KALPANA, G.V., NISHITA NAIK, V., VASAVARAJA, H.K., RAMASWAMI, G.N. & DATTA, R.K. (2001). Evaluation and identification promising bivoltine hybrids of silkworm (*Bombyx mori* L.) for tropics. Int. J. Indust. Entomol., 3(1): 31-35.

CARACTERISATION ET EVALUATION DES RESSOURCES GENETIQUES DU VER A SOIE TASAR DU CHENE EN INDE

N. IBOTOMBI SINGH*¹, L. SOMEN SINGH & K. C. SINGH

Regional Tassar Research Station, Central Silk Board, Imphal – 795 001, Inde.

1. Central Muga Eri Research and Training Institute, Central Silk Board, Lahdoigarh, Jorhat -785 700, Inde.

On a étudié les caractères morphologiques de quatre espèces du papillon soyeux du tassar du chêne, c'est-à-dire *Antheraea roylei*, *A. proylei*, *A. frithi*, *A. pernyi* et quatre lignées exploitées commercialement PRP5, PRP12, Blue et C27 conservées dans la banque de ressources génétiques de la Station Régionale de Recherche sur le Tassar, Imphal (en Inde). Pour les caractères du cocon et du papillon, *A. roylei* et *A. frithi* diffèrent des deux autres espèces et des quatre lignées, tandis qu'il n'y a pas beaucoup de différences entre *A. proylei*, *A. pernyi* et les quatre lignées sauf pour la taille et le poids. L'œuf d'*A. frithi* est jaune crème et sans méconium, tandis que les œufs des autres génotypes sont de couleur marron avec un méconium. On a enregistré des variations de couleur et de poids des larves chez les différents génotypes. On a estimé les performances d'élevage des quatre génotypes du ver à soie tassar du chêne d'après la méthode de l'indice d'évaluation (E. I.) de caractères multiples pour huit caractères contribuant au rendement et on a identifié les lignées supérieures. Le génotype C27 enregistre les valeurs E. I. les plus élevées pendant toutes les saisons, ce qui indique qu'il convient à l'élevage pendant toutes les saisons. *A. frithi*, qui présente les valeurs E. I. individuelles les plus élevées pour le taux effectif d'élevage et le rendement en cocons pour la récolte d'été s'avère être tolérant à la température et à l'humidité élevées et convient à l'élevage d'été / d'automne.

INTRODUCTION

La Chine et l'Inde sont les deux principaux pays de production de soie grège tassar du chêne à l'échelle mondiale. *Antheraea pernyi* Guerin Menevelli et *Antheraea proylei* Jolly sont les deux espèces qui produisent principalement de la soie tassar du chêne. En Inde, on conserve aussi *A. roylei* Moore. et *A. frithi* Moore. dans la banque de ressources génétiques avec des lignées mises au point pour être utilisées dans le lignage et dans la production de soie tassar commerciale. Le ver à soie se nourrit sur les feuillages de *Quercus acutissima*, *Q. griffithii*, *Q. floribunda*, *Q. leucotrichophora*, *Lithocarpus dealbata*, etc... On procède à l'élevage des jeunes âges à l'intérieur et à partir du 3^{ème} âge jusqu'au filage l'élevage est réalisé à l'extérieur. En Inde, l'élevage tassar du chêne joue un rôle important dans l'amélioration économique de la partie la plus faible de la société, qui habite dans la zone du chêne dans la région sub-himalayenne qui s'étend au Manipur, au Nagaland, à l'Assam, au Mizoram, au Meghalaya et à l'Arunachal Pradesh dans le nord-est et au Jammu Cachemire, à l'Himachal Pradesh et à l'Uttarkhand dans la région du nord-ouest de l'Himalaya. L'élevage de la récolte du printemps commence à partir de la première / deuxième semaine de mars et après 35 à 45 jours d'alimentation, les larves filent leurs cocons. Comme elles sont élevées à l'extérieur, elles sont soumises à des maladies, des parasites et des prédateurs variés, ce qui entraîne une mortalité élevée. La récolte du printemps est la principale récolte de grainage ou commerciale et ensuite 75 à 85 % des

* Auteur auquel adresser la correspondance, E-mail : ibotombisingh@yahoo.co.in

nymphes subissent une diapause pendant 7 à 8 mois. Dans le nord-est de l'Inde, l'élevage commercial est limité seulement à la saison du printemps. Des récoltes supplémentaires sont entreprises à petite échelle pendant l'été ou l'automne en interrompant la diapause nymphale par le traitement photopériodique des nymphes pendant 16 à 17 heures pendant 18 à 25 jours. Cependant, les fermiers ne sont pas intéressés par l'élevage du ver à soie tassar du chêne pendant l'été et l'automne en raison de la faible récolte pendant ces saisons. Toutefois, l'élevage de la récolte d'été / d'automne est faisable sur le plan pratique et indispensable pour augmenter les bénéfices économiques de l'élevage dans la région. Il est donc nécessaire d'identifier les espèces / les lignées spécifiques aux saisons. Il faut réaliser des études sur la performance en fonction des saisons des quatre espèces et des dix lignées conservées dans la banque génétique de la Station Régionale de Recherche du Tassar à Imphal (Inde). On a besoin de caractériser systématiquement les espèces et les lignées *Antheraea* nourries sur le chêne disponibles dans cette région pour qu'elles soient facilement référencées pour les sélectionneurs afin qu'ils les utilisent correctement, lorsqu'ils entreprennent des recherches de breeding systématique pour améliorer les caractères économiques.

En sériciculture, on considère que de nombreux caractères sont importants pour augmenter le rendement en soie et chaque caractère contribue à différents degrés à l'augmentation du rendement en soie. Il est rare que tous les caractères contribuant au rendement soient supérieurs chez une lignée unique. Il est donc nécessaire d'identifier les lignées et les hybrides supérieurs d'après l'effet cumulatif de différents caractères. Plusieurs méthodes sont employées pour l'évaluation simultanée de caractères multiples pour identifier les génotypes supérieurs (Arunachalam et Bandyopadhyay, 1984 ; Grower, 1971 ; Kalpana et coll., 1998 ; Mano et coll., 1993). Parmi les différentes méthodes d'évaluation utilisées chez le ver à soie, la méthode de l'indice d'évaluation des caractères multiples (E. I.) de Mano et coll., (1993) a été largement utilisée pour la sélection de lignées et d'hybrides supérieurs (Harjeet Singh et Suresh Kumar, 2008 ; Kariappa et Rajan, 2005 ; Naseema Begum et coll., 2000 ; Nazia Choudhary et Ravindra Singh, 2006 ; Rajlakshmi et coll., 2000 ; Ramesh Babu et coll., 2002 ; 2005 ; Ravindra Singh et coll., 2001 ; Singh et Subha Rao, 1998 ; Sudhakara Rao et coll., 2001). Dans cet article, nous présentons les différentes caractéristiques des ressources génétiques du ver à soie tassar du chêne et les génotypes supérieurs adaptés aux récoltes du printemps et de l'été / automne.

MATERIELS ET METHODES

On recueille quatre espèces *Antheraea*, c'est-à-dire *Antheraea proylei* Jolly, *Antheraea pernyi* Guerin Mcneveli, *Antheraea roylei* Moore et *Antheraea frithi* Moore et dix lignées, c'est-à-dire PRP₂, PRP₃, PRP₅, PRP₁₂, RPP₄, Blue, C27, Yellow, Blue6 et BlueYellow1 auprès de la banque génétique de la Station Régionale de Recherche du Tassar Imphal (Inde) et on les utilise dans cette étude. Parmi les dix lignées, on reçoit Blue6 et Blue Yellow1 de Chine en 1998, tandis que les huit lignées restantes sont isolées dans cette station de recherche. Les quatre espèces *Antheraea proylei*, *Antheraea pernyi*, *Antheraea roylei* et *Antheraea frithi* et les quatre lignées isolées exploitées commercialement, c'est-à-dire PRP₅, PRP₁₂, Blue et C27 sont caractérisées morphologiquement pendant les différents stades de développement. L'élevage des jeunes vers de tous les génotypes est réalisé à l'intérieur et à partir du troisième âge, on réalise l'élevage à l'extérieur à Imphal, en Inde (785 m au-dessus du niveau de la mer, longitude 93,94° E et latitude 24,83° N). L'élevage d'*A. proylei*, d'*A. pernyi* et des dix lignées est réalisé sur le feuillage de *Q. acutissima*, tandis qu'*A. roylei* et *A. frithi* sont élevés sur le feuillage de *Lithocarpus dealbata* à la fois pendant les saisons du printemps et de l'été / automne.

Pour l'évaluation, on enregistre les caractères contribuant au rendement, c'est-à-dire la fécondité, le % d'éclosion, le taux effectif d'élevage (% ERR), le nombre de cocons par ponte saine, le poids d'un cocon, le poids d'une coque, la richesse soyeuse (% RS) et la longueur du filament. On classe

les différentes espèces et lignées en suivant la méthode de l'indice d'évaluation des caractères multiples de Mano et coll., (1992 – 1993), qui est présenté ci-dessous :

$$\text{Indice d'évaluation (E. I.)} = \frac{A - B}{C} \times 10 + 50$$

où

A = valeur individuelle du génotype

B = valeur moyenne d'un caractère particulier des génotypes

C = écart type du caractère particulier

10 = unité standard

50 = valeur fixée

On calcule les valeurs de l'indice d'évaluation pour les caractères individuels de chaque génotype et on obtient la valeur moyenne de l'indice cumulatif pour les huit caractères étudiés. Le génotype qui enregistre des valeurs moyennes de l'indice > 50 est pris en compte pour la sélection et les génotypes qui enregistrent une valeur moyenne de l'indice < 50 sont considérés inférieurs.

RESULTATS ET DISCUSSION

Caractérisation morphologique :

Plusieurs caractères morphologiques et quantitatifs de quatre espèces *Antheraea*, c'est-à-dire *Antheraea proylei* (n = 49), *Antheraea pernyi* (n = 49), *Antheraea roylei* (n = 31) et *Antheraea frithi* (n = 31) et de quatre lignées exploitées commercialement, c'est-à-dire PRP5, PRP12, Blue et C27 sont présentés dans le Tableau I.

Pour la couleur et la forme du cocon, il n'y a pas de différence significative entre *A. pernyi*, *A. proylei* et les huit autres lignées. *A. roylei* est unique car il a des cocons à double couche de couleur blanche dont la coque externe n'est pas dévidable et dont seule la coque interne est dévidable. Les cocons d'*A. frithi* sont plus durs et compacts avec moins de bourre. On enregistre une variation du poids du cocon, du poids de la coque soyeuse, de la richesse soyeuse, de la dévidabilité, de la longueur du filament, du titre et de la longueur du pédoncule chez tous les génotypes.

Le poids de la chrysalide femelle est plus élevé que celui de la chrysalide mâle et on enregistre une variation de poids entre les chrysalides mâles et femelles chez tous les génotypes. C27 enregistre le poids le plus élevé de la chrysalide mâle (4,99 – 6,64 g) et femelle (6,02 – 10,40 g) et *A. frithi* enregistre le poids le plus faible de la chrysalide mâle (2,5 – 4,5 g) et femelle (3,6 – 6,3 g). On observe des variations de l'envergure et de la surface des ailes à la fois chez les papillons mâles et femelles chez tous les génotypes avec les données les plus élevées chez C27. Chez *A. frithi*, on observe une variation de la couleur morphologique des papillons. Le papillon mâle est soit jaune verdâtre ou rouge brique, tandis que le papillon femelle est soit jaune, marron clair ou marron verdâtre. Les œufs de tous les génotypes sont de forme elliptique, de couleur marron, avec un méconium sauf chez *A. frithi* dont les œufs sont de couleur jaune crème sans méconium.

Il y a des variations de la couleur des larves mûres chez les différents génotypes, qui va de vert foncé à bleu. Chez *A. frithi*, la couleur des larves varie de vert clair à vert bleu. On observe aussi des variations de la couleur de la larve chez *A. roylei*, tandis que chez les papillons, la couleur varie de gris verdâtre chez le mâle à marron brique chez la femelle.

A. proylei, *A. pernyi* et les dix autres lignées se comportent comme des bivoltins faibles à une latitude entre 22° C et 35° N, tandis qu'*A. roylei* et *A. frithi* sont des bivoltins purs dans la même fourchette de latitude. Après la formation du cocon, le ver à soie subit une diapause au stade de la chrysalide. Normalement, on n'élève qu'une récolte en mars-avril dans la région du nord-est de l'Inde à partir de l'émergence naturelle des papillons. Cependant, des élevages d'été et d'automne sont

réalisés en interrompant la diapause nymphale pendant 16 à 17 heures de traitement photopériodique à $22 \pm 2^\circ$ et 65 à 80 % d'H. R. pendant 20 à 25 jours.

Evaluation de l'élevage et du rendement :

Les valeurs de l'indice d'évaluation chez quatorze génotypes pour huit caractères importants contribuant au rendement pendant les récoltes du printemps et de l'été / automne sont présentées respectivement dans les Tableaux II, III et IV. Les résultats révèlent qu'aucun des génotypes n'est supérieur au génotype témoin *A. proylei* pour tous les caractères pendant les trois saisons. Chaque génotype n'est supérieur que pour certains caractères. Des observations similaires ont été rapportées chez le ver à soie mûrier (Asma Maqbool et coll., 2005).

Pendant la récolte du printemps, neuf génotypes présentent des valeurs moyennes de l'indice d'évaluation > 50 (50,11 à 59,45), comme le montre le Tableau III.

La lignée C27 qui enregistre la valeur moyenne de l'E. I. la plus élevée de 59,45 et des valeurs individuelles de l'indice d'évaluation > 50 pour les huit caractères est considérée comme la meilleure lignée, suivie par PRP12 avec une valeur E. I. moyenne de 55,92 et des valeurs E. I. individuelles > 50 pour sept caractères en enregistrant les valeurs les plus élevées pour quatre caractères. Trois lignées c'est-à-dire PRP3, PRP12 et Blue Yellow-1 présentent des valeurs individuelles E. I. > 50 pour sept caractères et des valeurs E. I. moyennes chacune > 50 . Les deux génotypes Blue-6 et Blue présentent des valeurs E. I. moyennes > 50 et des valeurs E. I. individuelles > 50 chacun pour six caractères. Ces génotypes, qui possèdent des valeurs E. I. supérieures peuvent être utilisés pour la production de cocons commerciaux.

D'après le Tableau III, on observe que pendant la récolte d'été, huit génotypes enregistrent des valeurs E. I. moyennes > 50 (50,38 à 62,00). La lignée C27 qui enregistre les valeurs E. I. moyennes les plus élevées de 62,00 et des valeurs E. I. individuelles > 50 pour les huit caractères est considérée comme la meilleure lignée. *Antheraea frithi* se classe deuxième en présentant une valeur E. I. moyenne de 59,25 et enregistre les valeurs individuelles les plus élevées pour quatre caractères économiques importants, c'est-à-dire l'éclosion, le rendement moyen en cocons, le taux effectif d'élevage (E. R. R.) et la richesse soyeuse. La lignée Blue qui enregistre une valeur E. I. moyenne de 55,66 et des valeurs E. I. individuelles > 50 pour sept caractères est considérée comme la troisième meilleure lignée. On peut exploiter ces trois génotypes pour la production commerciale de cocons pendant la récolte d'été.

Pendant la récolte d'automne, cinq génotypes présentent des valeurs E. I. moyennes > 50 (Tableau IV). C27 enregistre la valeur E. I. moyenne la plus élevée de 62,09 et des valeurs E. I. individuelles > 50 pour les huit caractères, ce qui indique sa supériorité par rapport aux autres génotypes. *Antheraea frithi* présente une valeur E. I. moyenne de 57,35 et les valeurs E. I. individuelles les plus élevées pour trois caractères. Les génotypes Blue, Blue Yellow 1 et Blue-6 présentent des valeurs individuelles E. I. > 50 pour respectivement sept, six et cinq caractères. On observe donc que ces génotypes pourraient être utilisés pour la production de soie tassar commerciale pendant la récolte d'automne. Les valeurs E. I. les plus élevées pour la productivité en cocons et l'E. R. R. d'*A. frithi* pendant les récoltes d'été et d'automne montrent que ce génotype est tolérant à une température élevée (30°C - 35°C) et à une humidité élevée (80 à 95 %) et on pourrait donc l'utiliser pour l'élevage commercial pendant ces saisons.

Chez les vers à soie, de nombreux caractères sont considérés comme importants sur le plan économique puisque chacun d'eux contribue au rendement en soie à différents degrés. Il est donc juste de prendre une décision d'ensemble dans la sélection des lignées / hybrides prometteurs d'après un certain nombre de caractères importants contribuant au rendement par un indice commun donnant un poids égal à tous les caractères (Mano et coll., 1993 ; Bhargava et coll., 1993 ; 1994 ; Rajalakshmi et coll., 2000 ; Narayanaswami et coll., 2002 ; Neog et coll., 2008). Les sélectionneurs de ver à soie ont appliqué plusieurs méthodes statistiques pour évaluer le matériel ressource de lignage dont la méthode de points collectifs basée sur des caractères dépendants (Arunachalam et Bandyopadhyay,

1984) et la méthode d'évaluation des caractères multiples (Mano et coll., 1992) ont été largement adoptées, puisqu'on juge la supériorité des génotypes par la manifestation phénotypique de nombreux caractères. Dans cette étude C27 présente une supériorité par rapport aux autres génotypes pendant toutes les saisons, ce qui montre qu'on peut exploiter ce génotype pour la production commerciale de cocons pendant toutes les saisons. On pourrait utiliser les génotypes qui manifestent des valeurs $E. I > 50$ dans de futurs programmes de breeding pour la mise au point de lignées et d'hybrides à rendement élevé.

APPLICATIONS OF DNA MARKERS IN UZI FLY (DIPTERA)

B. C. KESHA MURTHY¹* & H. P. PUTTARAJU²

1. Marker Assisted Selection Laboratory, Dept. of Genetics and Plant Breeding, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore-560 065, India.
2. Laboratory of Seri-Biotechnology, Department of Biological Sciences, Bangalore University, Bangalore-560 056, India.

Among 4 species of uzi fly known, Mulberry silkworm uzi fly causes considerable damage to the sericulture industry. Uzi flies have been subjected to the study of their various aspects including their behavior, mode of parasitization, morphology, cytology, embryology. Detailed investigation related to sequence variability of this fly has been very scanty and very recently studies on molecular divergence and analysis of genetic diversity for *Wolbachia* gene sequences have been carried out. DNA markers have made a significant contribution to rapid rise of molecular studies of genetic relatedness, phylogeny, population dynamics or gene and genome mapping in insects. DNA markers in entomology have been very vast and still entomologists are getting more familiarized with the refinement of marker systems and are applying the technique to study the insect genomes more efficiently. The current review highlights the applications of molecular markers in uzi fly and explores some of the key areas like ecology, mating, parentage, behavior studies, genome and QTL mapping wherein high throughput genotyping methodologies are applied for better understanding of the fly at molecular level.

Keywords: DNA markers, mulberry silkworm, uzi fly, sericulture.

INTRODUCTION

Among the various pests of silkworm, Uzi fly of Tachinidae family assumes to be very important and causes considerable loss in cocoon production all over sericulture practicing countries. The uzi fly is known to cause 40% cocoon crop loss in some seasons in Eastern regions of India (Anonymous, 1982). During 1962–63, over 80% of cocoon production was lost in Malda district of West Bengal due to uzi fly infestation (Krishnaswami *et al.*, 1964). In Karnataka, the movement of cocoons over long distances and inefficiency of rearers to destroy affected crops has helped the spread of the pest throughout the state. Up to 80% of the cocoon crops of farmers are reported to be affected and several farmers lost the crop completely and repeatedly. The cocoon yield was reduced from 40 kg to as low as 5–10 kg due to fly incidence (Anonymous, 1982). Among the total mulberry cocoon production in India, Karnataka alone accounts for 60% and first survey conducted indicated the spread of the pest to nearly 170 villages, covering 400 km and 4000 sericulturists in traditional areas of Karnataka (Jolly, 1987).

Four species of uzi flies are known today which are., the Japanese uzi fly, *Crossocosmia sericaria* (Rodani); the Hime uzi fly, *Ctenophora pavidus* (Meigen); the Tasar uzi fly, *Blepharipa zebina* (Walker) and the Indian uzi fly, *Exorista sorbillans* (Wiedemann). Because of their impact of parasitism at their maggot stage on silkworm, these pests are known to cause a great damage to

* keshavamurthybc@gmail.com

sericulture industry and have been a subject for investigators for quite some time. Among them, Tasar and Indian uzi flies have been attracting more researchers mainly because the flies causes a great loss to respective non mulberry and mulberry sericulture industry which are known to provide a gainful employment to weaker sections and earns high foreign exchange in many developing countries including India. Uzi flies have been studied for different aspects of its behavior, mode of parasitization and control measures (Narayanaswamy and Devaiah, 1998). Various morphological aspects of the fly were described by Krishnaswamy *et al.* (1964), Narayanaswamy and Devaiah (1998), Sengupta *et al.* (1990), detailed cytological information (Puttaraju, 1995, 1997), embryology (Manjunatha, 1993, 1996), morphology (Manjunatha, 1993) and control measures (Narase Gowda 2002) for the Indian uzi fly. But detailed investigation related to sequence variability has been very scarce and only recently molecular divergence studies Chatterjee, 2003, 2005, Puttaraju *et al.*, 2007 and analysis of genetic diversity for Wolbachia gene sequences have been carried out (Puttaraju and madhu, 2002).

DNA markers have made a significant contribution to rapid rise of molecular studies of genetic relatedness, phylogeny, population dynamics or gene and genome mapping in insects (Loxdale and Lushai, 1998, Avise 2000, 2004, Severson *et al.*, 2001, Heckel, 2003). Advancement in development of different types of DNA markers have enhanced reproducibility, power of resolution and more importantly, the cost and time consumption in developing and scoring the marker loci has been considerably reduced. Since then, application of DNA markers in entomology has been very vast and entomologists are getting more familiarized with the refinement of marker systems and are applying the technique to study insect genomes more efficiently. The present review describes the applications of different markers in studying the genetic architecture of the uzi fly and important trust areas of marker applications.

Insect Ecology:

Ecological research on insect species provides valuable information on population structure, speciation, gene flow and genetic diversity, and provide explanation on insect diversity based on their interaction with environmental factors, either biotic or abiotic. Molecular marker data help to distinguish between different species, when there is no other comprehensive way available to do so. The traditional approach of discriminating two species could be testing if members of the two populations cannot produce fertile offspring. With respect to uzi fly, a quantum of information has been generated and well documented in India particularly in Karnataka with regard to its distribution but systematic survey of different agro-climatic zones particularly in new sericultural zones of the country has not been undertaken. In insects, DNA markers are used to estimate the genetic diversity and gene flow between species, identifying haplotypes and lineages or predicts migration and colonization history (Hale and Singh, 1991, Yoon and Aquadro, 1994, Behura *et al.* 2001b, Salvato *et al.*, 2002, Llewellyn *et al.*, 2003, Bosio *et al.*, 2005). It has been reported earlier (Narayanaswamy and Devaiah, 1998) that the uzi fly is distributed in 22 countries and no efforts were made on collection, conservation and genetic analysis at the sequence level. Gene flow and genetic variations within and between insect species, measured from marker data, are critical to establish meaningful explanation for population structure and dynamics (Cervera *et al.* 2000, Takami *et al.* 2004, Mendelson and Shaw, 2005).

Mating and parentage:

To elucidate an effective understanding of insect genetic systems, DNA markers were used to validate the theoretical models that predict influence of paternal care on reproductive success in insect species such as golden egg bugs, *Phyllomorpha laciniata* Villers (Heteroptera, Coreidae) (Garcia-Gonzalez *et al.* 2003). As mating history in uzi fly is not well known, marker systems offers a lot of scope in knowing the paternity of male and female uzi flies. It is evident from literature that

uzi fly can parasitize as many as 95 species of insects, but can complete the life -cycle successfully on a few hosts only. By using RAPD markers life cycle variation traits associated with aphids have been converted into codominant markers (Simon *et al.* 1999) and using these SCAR markers in segregating and natural populations of known breeding systems, complete linkage was found in segregating populations. Such studies using different geographic collections of uzi flies will help in identifying linkage between markers and traits involved in life cycle variation.

Genome and QTL mapping:

Genetic linkage mapping, based on recombination frequency, uses DNA markers for tagging and mapping of specific genes and QTLs in insects. Construction of genetic map uses segregating populations (generally F₂ backcross progenies) to genotype them at hundreds of marker loci. Based on the inheritance pattern of these loci, multipoint linkage analysis is performed to generate different linkage groups. In insects, RAPD and AFLP markers have been extensively used to generate genetic maps. RAPD-based linkage maps have been constructed for genomes of honeybee (Hunt and Page, 1995), silkworm (Yasukochi, 1998), beetle (Beeman and Brown, 1999, Yezerski *et al.* 2003) and sawfly (Nishimori *et al.* 2000), whereas AFLP-based linkage maps are available for genomes of silkworm (Tan *et al.* 2001), Colorado potato beetle (Hawthorne, 2001), red flour beetle (Zhong *et al.* 2004), Hawaiian cricket (Parsons and Shaw, 2002), European corn borer (Dopman *et al.* 2004), Hessian fly (Behura *et al.* 2004) and butterfly (Wang and Porter 2004, Tobler *et al.* 2005). Microsatellite-based maps have also been constructed for the genomes of *Drosophila melanogaster* (Staten *et al.* 2004) and honeybee (Solignac *et al.* 2004). Apart from genome mapping, DNA markers are also used to tag and map specific gene(s) responsible for a phenotypic trait in insects. Uzi fly on primary analysis with markers has showed considerable variation within south Indian populations (Chatterjee, 2003, 2005, Prakash *et al.* 2009) and offers a great opportunity in mapping many genetic traits. Some of the important traits like, fecundity, mating behavior, traits behind host selection, foraging behavior, resistance to insecticides, sperm productivity, resistance to abiotic factors and autocidal behavior could be mapped with molecular markers. Many of these economical and behavioral traits are polygenic in nature and involves QTL mapping.

Behavioral studies:

Behavioral plasticity in social insects represents a complex biological phenomenon that is getting attention of molecular biologists. Honeybee (*Apis mellifera*) is an emerging model organism that is being studied for social behavior at molecular level (Robinson *et al.* 2005). At the behavior level uzi fly is very less understood and assumes to be material of research. The specificity of the Tasar uzi fly on only Tasar silkworms is an interesting phenomenon and needs to be deduced with DNA markers. Host selection of the mulberry silkworm uzi fly is another important phenomenon involving lot of behavioral factors. The role of sex pheromone in mating behavior of uzi fly has been determined by using crude abdominal extracts in Y-maze tube, and the response of male fly to female odour is obvious. Knowing the genetic background behind such factors helps to formulate an effective control method for the uzi fly.

CONCLUSION

The field of DNA marker technology is fast progressing by adopting new forms and innovative approaches of the existing genetic principles in detecting DNA polymorphism and insects were also the subject of study with coverage of numerous insect species. But DNA marker systems are invariably suited for improvement of traits in plants and animals and numerous traits have already been genetically mapped. While applying such system to a pest of an economically important insect, careful selection of targeted trait of interest should be made. Besides *Bombyx mori*, about 95 species of insects

belonging to Lepidoptera and Hymenoptera are known infected by uzi fly. Economically it may be very important insect parasitizing many of the Lepidopteran insects which are devastating in many of the agricultural important crops. On the other hand by infesting silkworm it becomes a serious pest. Hence DNA markers are invariably effective tools in knowing the important traits behind the quantitative trait loci.

REFERENCES

- ANONYMOUS. (1982) Proc. Workshop on Uzifly. CSR&TI, Mysore, pp. 11.
- AVISE, J. C. (2000) In: *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- AVISE, J. C. (2004) In: *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, 2nd edn, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 684.
- BEHURA, S. K., VALICENTE, F. H., RIDER, S. D. Jr *et al.* (2004) A physically anchored genetic map and linkage to avirulence reveals recombination suppression over the proximal region of Hessian fly chromosome A2. *Genetics*, 167: 343–355.
- BEHURA, S. K., SAHU, S. C., MOHAN, M *et al.* (2001b) *Wolbachia* in the Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason): correlation between host mitotypes and infection status. *Insect Mol. Biol.*, 10: 163–171.
- BEEMAN, R. W. AND BROWN, S. J. (1999) RAPD-based genetic linkage maps of *Tribolium castaneum*. *Genetics*, 153: 333–338.
- BOSIO, C. F., HARRINGTON, L. C., JONES, J. W. *et al.* (2005) Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. *A. J. of Trop. Medicine and Hygiene*, 72: 434–442.
- CERVERA, M. T., CABEZAS, J. A., SIMON, B. *et al.* (2000) Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bull. of Ent. Res.*, 90: 391–396.
- CHATTERJEE, S. N., MOHANDAS, T. P. AND TANUSHREE T. (2003) Molecular characterization of the gene pool of *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae) a parasitoid of silkworm, *Bombyx mori*, in India. *Eur. J. Entomol.* 100: 195–200.
- CHATTERJEE, S. N., TARAPHDAR, T. AND MOHANDAS, T. P. (2005) Molecular analysis of divergence in tachinid Uzi (*Exorista sorbillans*) populations in India. *Genetica*. 125: 1–15.
- DOPMAN, E. B., BOGDANOWICZ, S. M. AND HARRISON, R. G. (2004) Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics*, 167: 301–309.
- GARCIA-GONZALEZ, F., NUNEZ, Y., PONZ, F. *et al.* (2003) Sperm competition mechanisms, confidence of paternity, and the evolution of paternal care in the golden egg bug (*Phyllomorpha laciniata*). *Intl. J. of Organic Evol.* 57: 1078–1088.
- HALE, L. R. AND SINGH, R. S. (1991) A comprehensive study of genetic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV. Mitochondrial DNA variation and the role of history vs. selection in the genetic structure of geographic populations. *Genetics*, 129: 103–117.
- HAWTHORNE, D. J. (2001) AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene. *Genetics*, 158: 695–700.
- HECKEL, D. G. (2003) Genomics in pure and applied entomology. *Annu. Rev. of Entomol.*, 48: 235–260.
- HUNT, G. J. AND PAGE, R. E. (1995) Linkage map of the honeybee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics*, 139: 1371–1382.
- JOLLY, M.S. (1987) In: *Uzifly, Its Identification, Prevention and Control*. CSR & TI, Mysore, Bull, No. 4, 8 pp.
- KRISHNASWAMI, S., JOLLY, M. S. AND DATTA, R. K. (1964) A study on the fly pest infestation of the larvae and cocoons of *Bombyx mori* L. *Ind. J. Sericul.* 3: 7–12.

- LEWELLYN, K. S., LOXDALE, H. D., HARRINGTON, R. *et al.* (2003) Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites. *Mol. Ecology*, 12: 21–34.
- LOXDALE, H. D AND LUSHAI, G. (1998) Molecular markers in entomology. *Bul. of Entomol. Res.*, 88: 577–600.
- MANJUNATHA, H. B. (1993) Morphological and Cytological investigations on the uzi fly, *Exorista bombycis* (Wied) (Diptera: Tachinidae). Ph.D. thesis. Bangalore University, Bangalore.
- MANJUNATHA, H. B. AND PUTTARAJU, H. P. (1996) Stages of Oogenesis correlated with the age of the uzi fly, *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae). *Sericologia* (France) 36: 107–118.
- MENDELSON, T. C. AND SHAW, K. L. (2005) Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology*, 395: 161–177.
- NARSE GOWDA, P. N. (2002) Effect of g-rays on the uzi fly *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae). Ph.D. thesis. Bangalore University, Bangalore.
- NARAYANASWAMY, K. C. AND DEVAIAH, M. C. (1998) In: Silkworm uzi fly, Zen publishers, Bangalore, India, pp. 11–34.
- NISHIMORI, Y., LEE, J. M., SUMITANI, M., *et al.* (2000) A linkage map of the turnip sawfly *Athalia rosae* (Hymenoptera: Symphyta) based on random amplified polymorphic DNAs. *Genes and Genetics Systems*, 75: 159–166.
- PARSONS, Y. M. AND SHAW, K. L. (2002) Mapping unexplored genomes: a genetic linkage map of the Hawaiian cricket *Laupala*. *Genetics*, 162: 1275–1282.
- PUTTARAJU, H. P. AND MADHU, M. (2002) Presence of *Wolbachia* endosymbionts in different silkworm races / species & in their uzi fly parasites. *J. Invertebr. Pathol.* 79: 120–122.
- PUTTARAJU, H. P. AND SHIVASHANKARAPPA, L. H. (1995) Application of the Diflubenzuron to control of the uzi fly, *E. bombycis* Louis (*E. sorbillans*) (Diptera: Tachinidae). *Sericologia* (France) 35: 755–758.
- PRAKASH, B. M., KESHA MURTHY, B. C., ANANDA, S. AND PUTTARAJU, H. P. (2009) Exploring heterogeneity in uzi fly, *Exorista sorbillans* Cytologia. 74(3): 259–266.
- ROBINSON G. E., GROZINGER C. M. & WHITEFIELD C. W. (2005) Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nat. Rev. Gen.* 6: 257–270.
- SALVATO, P., BATTISTI, A., CONCATO, S. *et al.* (2002) Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampawilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecology*. 11: 2435–2444.
- SENGUPTA, K., KUMAR, P., BAIG, M. AND GOVINDAIAH. (1990) In: Handbook on Diseases and Pests of Silkworm and Mulberry. ESCAP, United Nations, Bangkok, Thailand, pp. 67–73.
- SEVERSON, D. W., BROWN, S. E. AND KNUDSON, D. L. (2001) Genetic and physical mapping in mosquitoes: molecular approaches. *Annu. Rev. of Entomol.*, 46: 183–219.
- SHIVASHANKARAPPA, L. H. 1997. A comparative evaluation of Diflubenzuron and its application for the control of uzi fly, *E. sorbillans* (Wied.). Ph.D. thesis. Bangalore University, Bangalore.
- SIMON, J. C., LETERME, N. AND LATORRE, A. (1999) Molecular markers linked to breeding system differences in segregating and natural populations of the cereal aphid *Rhopalosiphum padi* L. *Mol. Ecology*, 8: 965–973.
- SOLIGNAC, M., VAUTRIN, D., BAUDRY, E. *et al.* (2004) A microsatellite based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics*, 167: 253–262.
- STATEN, R., SCHULLY, S. D. AND NOOR, M. A. (2004) A microsatellite linkage map of *Drosophila mojavensis*. *BMC Genetics*, 5: 12–18.
- TAKAMI, Y., KOSHIO, C., ISHII, M. *et al.* (2004) Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. *Mol. Ecology*, 13: 245–258.
- TAN, Y. D., WAN, C., ZHU, Y. *et al.* (2001) An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*, 157: 1277–1284.
- TOBLER, A., KAPAN, D., FLANAGAN, N. S. *et al.* (2005) First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity*, 94: 408–417.

- WANG, B. AND PORTER, A. H. (2004) An AFLP-based interspecific linkage map of sympatric, hybridizing *Colias* butterflies. *Genetics*, 168: 215–225.
- YASUKOCHI, Y (1998) A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 150: 1513–1525.
- YEZERSKI, A., STEVENS, L AND AMETRANO, J. (2003) A genetic linkage map for *Tribolium confusum* based on random amplified polymorphic DNAs and recombinant inbred lines. *Insect Mol. Biol.*, 12: 517–526.
- YOON, C. K. AND AQUADRO, C. F. (1994) Mitochondrial DNA variation among the *Drosophila athabasca* semispecies and *Drosophila affinis*. *J. of Heredity*, 85: 421–426.
- ZHONG, D., PAI, A. AND YAN, G. (2004) AFLP-based genetic linkage map for the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *J. of Heredity*, 95: 53–61.

APPLICATION DES MARQUEURS ADN CHEZ LA MOUCHE UZI (DIPTERE)

B. C. KESHA MURTHY^{1*} & H. P. PUTTARAJU²

1. Marker Assisted Selection Laboratory, Dept. of Genetics and Plant Breeding, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore – 560 065.
2. Laboratory of Seri-Biotechnology, Department of Biological Sciences, Bangalore University, Bangalore – 560 056.

Parmi 4 espèces connues de la mouche uzi, la mouche uzi du ver à soie mûrier provoque des dégâts considérables pour l'industrie séricicole. On a étudié plusieurs aspects de la mouche uzi y compris son comportement, son mode de parasitisme, sa morphologie, sa cytologie et son embryologie. Des recherches détaillées sur la variabilité des séquences de cette mouche sont très rares et très récemment des études ont été réalisées sur la divergence moléculaire et sur l'analyse de la diversité génétique des séquences de gène Wolbachia. Les marqueurs ADN ont significativement contribué à l'augmentation rapide des études moléculaires de parenté génétique, de phylogénie, de dynamique de population ou de cartographie des gènes et des génomes. En entomologie, les marqueurs ADN sont très vastes et les entomologistes se familiarisent avec le raffinement des systèmes de marqueurs et appliquent cette technique pour étudier les génomes plus efficacement. Cette étude passe en revue les faits les plus marquants concernant les applications des marqueurs moléculaires chez la mouche uzi et explore certains domaines clé comme l'écologie, l'accouplement, l'origine, les études de comportement et de cartographie QTL dans lesquelles on applique des méthodologies de génotypage à haut débit pour mieux comprendre la mouche uzi au niveau moléculaire.

INTRODUCTION

Parmi les différents insectes nuisibles du ver à soie, on admet que la mouche uzi de la famille des Tachinaires est très importante et provoque des pertes considérables de production en cocons dans tous les pays où on pratique la sériciculture. On sait que la mouche uzi provoque des pertes de cocons de 40 % pendant certaines saisons dans les régions de l'est de l'Inde (Anonyme, 1982). En 1962-63, plus de 80 % de la production de cocons a été perdue dans la zone de Malda dans le Bengale occidental en raison de l'infestation par la mouche uzi (Krishnaswami et coll., 1964). Dans le Karnataka, le déplacement des cocons sur de longues distances et le fait que les éleveurs ne détruisent pas efficacement les récoltes touchées ont contribué à la propagation de cet insecte nuisible dans tout l'Etat. On a rapporté que jusqu'à 80 % des récoltes de cocons sont touchées et les fermiers perdent complètement et régulièrement leurs récoltes. Le rendement en cocons est passé de 40 kg à 5 à 10 kg à cause de l'incidence de la mouche (Anonyme, 1982). Sur la production totale de cocons mûrier en Inde, le Karnataka à lui seul en représente 60 % de la production et la première étude réalisée a montré la propagation de la maladie dans presque 170 villages, couvrant 400 km et englobant 4000 sériciculteurs dans les zones traditionnelles du Karnataka (Jolly, 1987).

A l'heure actuelle, on connaît quatre espèces de mouches uzi qui sont la mouche uzi japonaise, *Crossocosmia sericaria* (Rodani), la mouche uzi Hime, *Ctenophora pavidus* (Meigen), la mouche uzi tassar, *Blepharipa zebina* (Walker) et la mouche uzi indienne, *Exorista sorbillans* (Wiedemann). En

* keshavamurthybc@gmail.com

raison de leur impact parasitaire au stade de l'asticot chez le ver à soie, on sait que ces insectes nuisibles provoquent des dégâts considérables pour l'industrie séricicole et ils ont été le sujet de recherches depuis quelques temps. Parmi elles, les mouches uzi tatar et indienne ont plus attiré l'attention des chercheurs, principalement parce que les mouches entraînent des pertes considérables pour l'industrie séricicole non mûrier et mûrier, qui fournissent des emplois lucratifs aux groupes les plus pauvres et rapportent beaucoup de devises étrangères pour les pays en voie de développement, y compris l'Inde. On a étudié différents aspects du comportement, du mode de parasitisme de la mouche uzi et les moyens de lutter contre elle (Narayanaswamy et Devaiah, 1998). Krishnaswamy et coll (1964), Narayanasamy et Devaiah (1998), Sengupta et coll., ont présenté plusieurs aspects morphologiques de la mouche, Puttaraju, 1995, 1997 des informations cytologiques détaillées, Manjunatha, 1993, 1996 son embryologie, Manjunatha (1993) sa morphologie et Narase Gowda, 2002 des moyens de lutte contre la mouche uzi indienne. Mais des recherches détaillées liées à la variabilité des séquences sont très rares et c'est seulement récemment que des études de divergence moléculaire (Chatterjee, 2003, 2005, Puttaraju et coll., 2007) et d'analyse de la diversité génétique pour les séquences de gènes *Wolbachia* ont été entreprises (Puttaraju et Madhu, 2002).

Les marqueurs ADN ont significativement contribué à l'augmentation rapide des études moléculaires de parenté génétique, de phylogénie, de dynamique de population ou de cartographie des gènes et des génomes chez les insectes (Loxdale et Lushai, 1998, Avise, 2000, 2004, Severson et coll., 2001, Heckel, 2003). Les progrès dans la mise au point de différents types de marqueurs ADN, ont amélioré la reproductibilité, le pouvoir de résolution et de manière plus importante le coût et le temps requis pour mettre au point et détecter les loci marqueurs ont considérablement diminué. Depuis, l'application des marqueurs ADN dans l'entomologie est devenue très étendue et les entomologistes se sont familiarisés avec le raffinement des systèmes marqueurs et ont appliqué la technique pour étudier les génomes des insectes plus efficacement. Cette revue décrit les applications de différents marqueurs pour étudier l'architecture génétique de la mouche uzi et les domaines fiables importants dans l'application des marqueurs.

Ecologie de l'insecte :

La recherche écologique chez les espèces d'insectes apporte des informations précieuses sur la structure de la population, la formation des espèces, le flux des gènes et la diversité génétique et des explications sur la diversité des insectes d'après leur interaction avec les facteurs environnementaux soit biotiques ou abiotiques. Les données sur les marqueurs moléculaires permettent de distinguer les différentes espèces, quand il n'y a pas d'autre façon globale disponible pour le faire. L'approche traditionnelle de distinction entre deux espèces pouvait être mise à l'épreuve si les membres des deux populations ne pouvaient pas produire de descendance fertile. En ce qui concerne la mouche uzi, on dispose d'une quantité d'informations et elles sont bien documentées en Inde, particulièrement dans le Karnataka, en ce qui concerne sa distribution, mais aucune étude systématique des différentes zones agro-climatiques en particulier dans les nouvelles zones séricicoles n'a été entreprise. Chez les insectes, on utilise les marqueurs ADN pour estimer la diversité génétique et le flux des gènes entre les espèces, en identifiant des haplotypes et des lignages ou pour prédire la migration ou l'histoire de la colonisation (Hale et Singh, 1991, Yoon et Aquadro, 1994, Behura et coll., 2001b, Salvato et coll., 2002, Llewellyn et coll., 2003, Bosio et coll., 2005). Auparavant, il a été rapporté (Narayanaswamy et Devaiah, 1998) que la mouche uzi était distribuée dans 22 pays, mais aucun effort n'a été fait sur le recueil, la conservation et l'analyse génétique au niveau des séquences. Le flux des gènes et les variations génétiques au sein et entre les espèces d'insectes et les données mesurées d'après les marqueurs sont cruciales pour établir une explication significative de la structure et de la dynamique d'une population (Cervera et coll., 2000, Takami et coll., 2004, Mendelson et Shaw, 2005).

Accouplement et origine :

Pour comprendre efficacement les systèmes génétiques des insectes, les marqueurs ADN ont été utilisés pour valider les modèles théoriques qui prédisent l'influence paternelle sur le succès de la reproduction chez les espèces d'insectes tels que la punaise aux œufs dorés, *Phyllomorpha laciniata* Villers (Hétéroptère, Coreidae) (Garcia-Gonzales et coll., 2003). Comme l'histoire de l'accouplement de la mouche uzi n'est pas bien connue, les systèmes marqueurs offrent de grandes possibilités pour connaître la paternité des mouches uzi mâles et femelles. Il est évident d'après la littérature que la mouche uzi peut parasiter jusqu'à 95 espèces d'insectes, mais ne peut réussir à achever son cycle de vie que sur quelques hôtes. Grâce aux marqueurs RAPD, les caractères de variation du cycle de vie chez les pucerons ont pu être convertis en marqueurs codominants (Simon et coll., 1999) et en utilisant ces marqueurs SCAR dans les populations sélectionnées et naturelles de systèmes de breeding connus, on a trouvé la liaison complète des populations sélectionnées. Des études de ce type utilisant différentes collections géographiques des mouches uzi permettront d'identifier la liaison entre les marqueurs et les caractères impliqués dans la variation du cycle de vie.

Génome et cartographie QTL :

La cartographie de la liaison génétique d'après la fréquence de recombinaison utilise les marqueurs ADN pour marquer et cartographier les gènes spécifiques et QTL chez les insectes. La construction de cartes génétiques utilise les populations sélectionnées (en général les descendance F2 de rétrocroisements) pour en dresser les génotypes avec des centaines de loci marqueurs. D'après la structure d'héritage de ces loci, on réalise une analyse de liaison multipoints pour obtenir différents groupes de liaison. Chez les insectes, les marqueurs RAPD et AFLP ont été largement utilisés pour générer des cartes génétiques. On a construit des cartes de liaison génétique basées sur les RAPD pour les génomes des abeilles (Hunt et Page, 1995), du ver à soie (Yasukochi, 1998), du scarabée (Beeman et Brown, 1999, Yezerski et coll., 2003) et de la tenthrède (Nishimori et coll., 2000), tandis que les cartes de liaison basées sur les AFLP sont disponibles pour les génomes du ver à soie (Tan et coll., 2001), du coléoptère de la pomme de terre de Colorado (Hawthorne, 2001), du coléoptère de la farine rouge (Zhong et coll., 2004), du criquet d'Hawaï (Parsons et Shaw, 2002), du perforateur européen du maïs (Dopman et coll., 2004), de la mouche de Hesse (Behura et coll., 2004) et du papillon (Wang et Porter, 2004 ; Tobler et coll., 2005). On a aussi construit des cartes basées sur les micro-satellites pour les génomes de *Drosophila mojavensis* (Staten et coll., 2004) et de l'abeille (Solignac et coll., 2004). En dehors de la cartographie des génomes, on a aussi utilisé les marqueurs ADN pour marquer et cartographier le(s) gène(s) spécifique(s) responsable(s) d'un caractère phénotypique chez les insectes. Lors de l'analyse primaire avec les marqueurs, la mouche uzi a montré une variation considérable dans les populations de l'Inde du sud (Chatterjee, 2003, 2005 ; Prakash et coll., 2009, ce qui offre de grandes possibilités pour cartographier les nombreux caractères génétiques. Certains des caractères importants comme la fécondité, le comportement d'accouplement, les caractères derrière le choix de l'hôte, le comportement de fouille, la résistance aux insecticides, la productivité du sperme, la résistance aux facteurs abiotiques et le comportement autocide pourraient être cartographiés avec les marqueurs moléculaires. Beaucoup de ces caractères économiques et comportementaux sont de nature polygénique et impliquent une cartographie QTL.

Etudes comportementales :

La plasticité comportementale chez les insectes sociaux représente un phénomène biologique complexe qui attire l'attention des biologistes moléculaires. L'abeille (*Apis mellifera*) est un organisme modèle émergent, qui est étudié pour son comportement social au niveau moléculaire (Robinson et coll., 2005). Au niveau comportemental, on comprend beaucoup moins la mouche uzi et on admet qu'elle est un matériel de recherche. La spécificité de la mouche uzi tassar qui n'est présente que chez les vers à soie tassar est un phénomène intéressant et il a besoin d'être illustré par des

marqueurs ADN. La sélection de l'hôte chez la mouche uzi du ver à soie mûrier est un autre phénomène important impliquant de nombreux facteurs comportementaux. On a déterminé le rôle de la phéromone sexuelle dans le comportement d'accouplement de la mouche uzi en utilisant des extraits abdominaux bruts dans un tube labyrinthe en Y et la réponse de la mouche mâle à l'odeur de la femelle est évidente. La connaissance du contexte génétique derrière des facteurs de ce type pourrait permettre de mettre au point une méthode de lutte contre la mouche uzi.

CONCLUSION

Le domaine de la technologie des marqueurs ADN progresse à grands pas grâce à l'adoption de nouvelles formes et approches innovatrices face aux principes génétiques existants dans la détection du polymorphisme de l'ADN et pour un grand nombre d'espèces d'insectes, les insectes sont aussi un sujet d'étude. Cependant, les systèmes de marqueurs ADN sont invariablement adaptés à l'amélioration des caractères chez les plantes et les animaux et de nombreux caractères ont déjà été cartographiés génétiquement. Lors de l'application d'un tel système à un insecte nuisible important sur le plan économique, il faut choisir soigneusement le caractère intéressant à cibler. En plus de *Bombyx mori*, on sait que 95 espèces d'insectes appartenant aux Lépidoptères et aux Hyménoptères sont infestées par la mouche uzi. Sur le plan économique, elle pourrait être un insecte très important car elle parasite de nombreux insectes Lépidoptères qui dévastent de nombreuses cultures agricoles importantes. Par ailleurs, en infestant le ver à soie elle devient un insecte nuisible majeur. Les marqueurs ADN sont donc invariablement des outils efficaces pour connaître les caractères importants derrière les loci d'un caractère quantitatif.

SPIRALLING WHITEFLY, *ALEURODICUS DISPERSUS* (RUSSELL) ON MULBERRY AND ITS MANAGEMENT PRACTICES

K. A. MURUGESH

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

Mulberry (*Morus spp.*) is prone to be infested by more than 300 species of insect pests, of which, the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* (Russell), a key pest on horticultural crops has gained notoriety over the past four to five years in sericultural belts of Southern India. The pest has more than 140 host plants. It causes an average leaf yield loss of 21 per cent with the incidence of more than 58 per cent in mulberry and the damage was severe during summer months. The injury results in phytotoxaemia which leads to crinkling and premature dropping of leaves with sooty mould infection. Besides damaging the crop plants, the white waxy material secreted by young ones spreads by wind and causes nuisance. The mulberry genotypes S39 and China White were found to be moderately resistant to spiralling whitefly.

Keywords: Mulberry, *Aleurodicus dispersus*, waxy flocculences, *Encarsia*, *Cryptolaemus*, chemicals.

INTRODUCTION

In India, mulberry is cultivated in about 0.217 million hectares covering 23 states. The crop is prone to be attacked by diverse organisms because of its fast growth and green foliage throughout the year, in varying proportions either for shelter, food or both. So far, over 300 insect and non-insect species of pests are known to infest mulberry in varying intensities during different stages of crop growth and season (Kotikal, 1982). Mulberry is susceptible to a wide array of pest complex belonging to a large number of sucking pests like scale insect, leaf hopper, mealybugs, thrips, mites, etc. Alerodids, commonly known as whiteflies, are small, inconspicuous phytophagous insects often overlooked despite their abundance. The name whitefly is derived from the whiter appearance of the adults and their tendency to fly readily when disturbed. Adults have a pair of floury wings which are usually white with a few veins. Puparia usually secrete wax with a distinct blue iridescence with the individual strands resembling minute glass fibres. Recently, the mulberry spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* (Russell) (Homoptera: Aleyrodidae), a key pest on many horticultural crops in different parts of the world has gained considerable notoriety over the past four to five years in all traditional sericultural zones of Southern states of India. In this context, it is imperative to acquire more knowledge about the key pest. Hence, the pest's spread, biology, host plants, symptoms of damage, population dynamics, reaction of mulberry genotypes against spiralling whitefly, biochemical changes in mulberry leaf, effect of affected leaves on economic characters of cocoon, natural enemies and management strategies are reviewed in this paper.

SPREAD

A. dispersus is a highly polyphagous pest and a native of the Caribbean region and Central America (Russell, 1965). It was introduced and assumed pest status in the Canary Islands in 1962 and Hawaii in 1978 (Paulson and Kumashiro, 1985), American Samoa and Guam in 1981 (Firman, 1982) and the Pacific islands (Waterhouse and Norris, 1989). The whitefly later spread westwards into several regions including Africa (Akinlosotu *et al.*, 1993) and Asia (Wijesekera and Kudagamage, 1990; Kajita *et al.*, 1991; Wen Hung Chich *et al.*, 1994). Subsequently, it was reported from Ghana, Congo, Brazil, Cuba, Philippines, Taiwan and other countries (Narendra Kumar *et al.*, 2004).

In South Asia, it is present in Maldives (Martin, 1990), Sri Lanka (Wijesekera and Kudagamage, 1990), Bangladesh (Scanlan, 1995) and India (Palaniswami *et al.*, 1995). It was first reported in India during 1993 from Kerala (Palaniswami *et al.*, 1995) and later from other parts of peninsular India (David and Regu, 1995; Prathapan, 1996; Geetha *et al.*, 1998; Sathe, 1999) and the Lakshadweep islands (Ramani, 2000).

BIOLOGY

Incubation period of spiralling whitefly eggs is reported to vary from seven to 10 days (Wijesekera and Kudagamage, 1990), nine to 11 days (Waterhouse and Norris, 1989) and four to six days in India (Douressamy *et al.*, 1997). The duration of second instar varies from four to five days, third instar lasts for five to seven days and fourth instar lasts from 10 to 11 days (Waterhouse and Norris, 1989). Douressamy *et al.* (1997) reported that the entire nymphal period of spiralling whitefly lasts from 14 to 21 days, pupal period from two to three days and total life cycle from 21 to 32 days. The total life cycle of spiralling whitefly lasts from 26 to 36 days (Wijesekera and Kudagamage, 1990). Females oviposit throughout their life span commencing within a day of emergence. Mated females produce offspring of both sexes, whereas unmated females produce male progeny only (Waterhouse and Norris, 1989).

The larval duration of each instar on mulberry tree was 5.3 ± 0.9 , 6.3 ± 0.43 , 5.2 ± 0.4 , 3.5 ± 0.54 days compared to the duration of 7.2 ± 0.6 , 7.6 ± 0.71 , 8.1 ± 0.54 and 5.5 ± 0.5 days for I, II, III and IV instars respectively on potted plants. The total nymphal period of spiralling whitefly on mulberry tree was completed in 16.8 ± 2.8 days than that of 28.2 ± 2.4 days on the potted plants. The total life cycle and adult longevity of spiralling whitefly developed from tree type mulberry plant was 25.0 ± 5.1 and 15.7 ± 2.42 days respectively. Whereas, whitefly reared on potted mulberry plant registered 35.5 ± 4.05 and 14.2 ± 3.51 days, respectively (Asiya Mariam, 1999).

HOST PLANTS

A. dispersus, being a polyphagous pest is known to attack a great number of plants in different countries where the pest was introduced. It was first collected on coconut in Florida (Russell, 1965). As many as 44 host plants in Florida, Central and South America and Caribbean Islands (Russell, 1965), 100 in Hawaii (Nakahara, 1978), 60 in Sarawak (Megir-Gumbek, 1987), 27 in Kiribati (Waterhouse and Norris, 1989), 22 in Indonesia (Kajita *et al.*, 1991) and 144 in Taiwan (Wen Hung Chich *et al.*, 1994) had been reported for the spiralling whitefly. In India, the pest was collected from wild tapioca and wild rubber by David and Regu (1995) and later on recorded on 70 (Prathapan, 1996), 22 (Ranjith *et al.*, 1996), 45 (Mani and Krishnamoorthy, 1997), 27 (Douressamy *et al.*, 1997) and 140 (Narendra Kumar *et al.*, 2004) plants. David and Regu (1995) enlisted 19 plants as hosts for spiralling whitefly and indicated mulberry as one of the most preferred hosts.

Asiya Mariam (1999) screened 200 plant species for spiralling whitefly and found that 53 species were damaged by the pest with varying levels of incidence viz., low (28 species), medium (14 species)

and high (11 species). Among the preferred plant families, Euphorbiaceae exhibited high level of susceptibility to spiralling whitefly followed by Solanaceae, Fabaceae, Malvaceae, Asteraceae and Labiaceae. According to Senguttuvan (2001) about 107 plant species were damaged by spiralling whitefly. Among them, 64 species recorded low level (25 % leaf damage), 24 species recorded medium level (26 - 50 % leaf damage) and 19 species recorded high level of damage (50 % leaf damage).

A survey on 18 alternative hosts belonging to the horticultural, ornamental, tree and weed plants revealed that the infestation was severe in guava, mulberry and forest plants like *Terminalia catappa* and *Tectona grandis* (Rajagopal Reddy *et al.*, 2001). Jagadish *et al.* (2004) reported the incidence of spiralling whitefly in 16 plant species which included papaya, *Hibiscus* spp., *Acalypha* spp., *Michelia champaca*, guava, cassava, castor, mulberry, *Terminalia* spp., etc.

SYMPTOMS OF DAMAGE

In mulberry, nymphs and adults were mostly found congregated on the lower surface of leaves (Douressamy *et al.*, 1997) and suck the sap. The infestation generally spreads from bottom to top. Young leaves mostly harbour less egg masses than matured leaves. The phytotoxaemia associated with spiralling whitefly damage are yellowish specklings on the leaves, crinkled leaves and premature dropping of leaves (Khan *et al.*, 2004).

Spiralling whitefly (*Dialeuropora decempunctata*) sucks the sap and causes chlorosis, dryness of leaves, leaf curl and sooty mould disease in mulberry (Bandyopadhyay and Santha Kumar, 2000; Khan *et al.*, 2004). Both the adults and nymphs feed on sap by sucking, due to which the leaves develop yellow specks. Within few days, the infestation spread to almost all the leaves and from the distance the canopy appears to be holding white powdery material. The infested leaves turn brownish at later stage. Both adults and nymphs secrete honeydew (gummy substance) on which sooty mould (fungus) develops. It gives black gummy appearance to the affected leaves which become unfit to feed silkworms (Narendra Kumar *et al.*, 2004).

Besides the direct damage to different crops, the pest also causes indirect ill effects to human beings by its waxy secretion. Copious white waxy flocculent material secreted by nymph is readily spread elsewhere by wind and creates a very great nuisance.

POPULATION DYNAMICS

The whitefly was present throughout the year in southern states of India, with high population in summer (March-June) and low in winter (October-January). The population was positively correlated with temperature and negatively correlated with humidity. Palaniswami *et al.* (1995) reported severe incidence in the post-rainy dry season between November and April which is at its low level in February in Kerala. Narayanaswamy and Ramegowda (1999) found high incidence of the pest on mulberry during April-June in Karnataka. Population of indigenous predators remained low and did not have any impact on the whitefly (Mani and Krishnamoorthy, 2000).

REACTION OF MULBERRY GENOTYPES TO SPIRALLING WHITEFLY

The results of population level of spiralling whitefly recorded over a period of 12 weeks showed that adult population per leaf was less than one in genotypes S708, Berhampur, BC 259, S46, China White, DD, S39, S1635 and C776, whereas genotypes S30, S40, S54, V1, C763 and C20 recorded moderate level of adult population (1.0 – 1.5). Genotypes M5, E Triploid, Palladam Local, Kosen and S13 harboured more whiteflies. Susceptibility/reaction of a cultivable variety to a pest, depends on the morphological and chemical constituents, which influence the host selection and development of

a pest species. Number of spirals was minimum in S36, C763, China White, Palladam local, S39, C7756, and S1 with less than one spiral per leaf. Genotypes S30, S708, Berhampur, BC 259, S54, China White, DD, S1635 harboured 1.0 to 1.5 spirals which are categorized into moderately resistant group. Higher spiral population was recorded in M5, E Triploid and S13.

A collective appraisal of spiralling whitefly adult population and spirals per leaf showed that genotypes S39 and China White recorded minimum adult and egg population as against higher population level in M5, R Triploid and S13. It is interesting to note that some of the genotypes like Palladam Local and S36 which were attractive to adult whiteflies registered fewer eggs (Asiya Mariam, 1999).

BIOCHEMICAL CHANGES IN MULBERRY LEAVES

Spiralling whitefly affected leaves were depleted with two important nutrients viz., carbohydrate and protein. The pest infestation caused drastic reduction in the moisture, chlorophyll a and b, crude protein, sugars, nitrogen, phosphorous, calcium and magnesium of mulberry leaves (Narayanaswamy *et al.*, 1999; Asiya Mariam, 1999).

IMPACT OF FEEDING OF SPIRALLING WHITEFLY INFESTED LEAVES ON ECONOMIC CHARACTERS OF SILKWORM

Feeding the silkworms with pest affected leaves was found to interfere with feeding physiology *vis-a-vis* cocoon characters and negative response was observed in respect of silkworm growth and cocoon yield (Narayanaswamy *et al.*, 1999). Adverse impacts such as longer larval duration, decreased food conversion and utilization, and reduction in economic parameters of the cocoon were noticed when the whitefly-infested mulberry leaves were fed to the silkworm, due to reduced nutrition levels in affected leaves (Asiya Mariam, 1999; Ahamed *et al.*, 1999; Narayanaswamy *et al.*, 1999).

Progressive decrease in effective rate of rearing was noticed with increased damage level. Leaves with 5, 10, 25, 50 and 75 per cent damage registered 82.00, 76.66, 68.66 and 62.00 per cent effective rate of rearing, respectively. Feeding the worms with cent per cent affected leaves resulted in 53.33 per cent effective rate of rearing. Feeding with healthy leaves recorded 86.66 per cent effective rate of rearing (Asiya Mariam, 1999). The economic parameters viz., larval weight, cocoon weight, shell weight, shell ratio, silk filament length and reelability were adversely affected when the silkworms were fed with the leaves infested by the spiralling whitefly (Mahadeva and Shree, 2003).

NATURAL ENEMIES

Parasitoids:

A. dispersus is native of Caribbean Islands and majority of natural enemies reported on *A. dispersus* are from West Indies. Though several species of parasites and predators were recorded on spiralling whitefly, the aphelinid parasite, *Encarsia haitiensis* was found promising in all the Islands. Successful control of spiralling whitefly within three months after the release of adults of *E. haitiensis* was reported in Lanai Islands (Anonymous, 1981). Parasitism levels of 30-68 per cent were observed due to both parasitoids in different parts of India during January-June 2000 and wherever there was heavy parasitism, the pest population was substantially brought down subsequently (Mani *et al.*, 2000). Parasitism levels were found to be highly density-dependent and also varied with host plants (Srinivasa *et al.*, 1999; Ramani, 2000). The pest is also attacked by hyperparasitoids, *Prospaltella divergens* Siv. and *E. merceti* Silv. (Eulophidae) which help in reducing the pest population (Sathc *et al.*, 1999). The parasitic behaviour and extent of parasitism in regulating the population of spiralling whitefly has not been documented yet.

Predators:

Next to aphelinid parasite, three coccinellid predators were found to be important against *A. dispersus* (Waterhouse and Norris, 1989). Lopez *et al.* (1997) found three species of the coccinellid, *Nephaspis* and a number of generalist predators including syrphids, chrysopids, spiders and ants preying on whitefly. Survey on the occurrence of natural enemies of spiralling whitefly on mulberry revealed the association of predators rather than parasitoids. Five coccinellids were recorded in field sampling. Among the coccinellids, population of *A. puttarudriahi* was higher followed by *C. montrouzieri* (Asiya Mariam, 1999). Encouraging the multiplication of natural enemies viz., *Chilocorus nigrata* F. and *C. montrouzieri* and *Apertochrysa* sp., *M. boninensis*, *M. astur* and *Chrysoperla carnea* was found to reduce the spiralling whitefly population/density in the mulberry (Rajagopal Reddy *et al.*, 2001). Mass multiplication and inundative release of predatory ladybird beetles viz., *C. montrouzieri* and *S. coccivora* which are known to feed on all the stages of spiralling whitefly and encouraging the ladybird beetles viz., *M. sexmaculatus* and *C. nigrata* which are abundantly available in mulberry gardens with a non-toxic environment for proliferation is found to be successful in managing the spiralling whitefly population (Narendra Kumar *et al.*, 2004).

MANAGEMENT STRATEGIES

Since *A. dispersus* is an exotic pest, very little work on the management practices has been carried out in India. Application of chemical insecticide alone is not enough for the management of spiralling whitefly, because of waxy covering on the pest the chemical may not reach targeted site and hence Integrated Pest Management (IPM) practices are necessary. Aleyrodid workers have started to develop different management practices for suppression of the pest which includes mechanical, physical and chemical methods.

Physical and mechanical methods:

Spraying of Fish Oil Rosin Soap (FORS) 4 per cent in early morning would minimise the incidence of spiralling whitefly (Douressamy *et al.*, 1997). The management practice of this pest involves collection and destruction of mulberry leaves with egg masses, nymphs and adults (Douressamy *et al.*, 1997) and spraying with strong jet of water at 12 l/minute at an interval of two days reduced the pest intensity drastically (Narendra Kumar *et al.* 2004).

Traps and trap catches:

Various types of traps have been designed based on the characteristic response of different whitefly species and used for pest monitoring (Mound, 1962). Setting up of yellow sticky traps at 10/4000m² was suggested for attracting the adults and for monitoring the pest (Douressamy *et al.*, 1997; Narendra Kumar *et al.* 2004). The efficiency of light trap was studied against spiralling whitefly. Number of adults trapped at bihourly interval was more in the early morning hours i.e., 4-6 am and it accounts to 97.9 per cent of the total catch (Asiya Mariam, 1999).

Chemical and botanical methods:

Chemical control is both uneconomical and impractical because of the pest's broad host range, widespread distribution and presence in areas with high human inhabitation (Kajita *et al.*, 1991). However, various synthetic chemical and non-chemical (Botanical) insecticides were evaluated for the control of *A. dispersus*. Kavitha Kirubavathy and Saranyamariammaninan (1999) observed the neem products as an effective formulation to control the spiralling whitefly. Application of 2 and 3 per cent neem oil and 2 per cent Neem Seed Kernel Extract (NSKE) were found to be effective in suppressing the adult whitefly population. For the control of nymphal population, 2 and 3 per cent neem oil, 3 per cent NSKE and 2 per cent neem oil + NSKE were reported to be promising. The

ovicidal action of different insecticides was tested against spiralling whitefly. Among the inorganics tested, dichlorvos recorded 89.38 per cent ovicidal mortality followed by malathion and phosalone. Among the organic insecticides, neem oil, neem seed kernel extract and pongamia oil recorded the mortality of 52.08, 53.56 and 59.27 per cent respectively (Asiya Mariam, 1999). No pest infestation was recorded when the mulberry was sprayed with neem oil 0.5 per cent (Rajagopal Reddy *et al.*, 2001) and 1 per cent (Bandyopadhyay and Santha Kumar, 2000; Khan *et al.*, 2004). Spraying with 0.038 per cent dichlorvos on affected portion of plants was found to have lethal effect on all stages of spiralling whitefly (Narendra Kumar *et al.*, 2004).

PROSPECTS

The incidence of whitefly, hitherto known mainly on horticultural crops, is being reported on mulberry in different parts of the country in recent years. Its fast spread, potential to attack and severity of the crop damage are a matter of concern. It may well turn into another major economic pest in near future. So, there is a necessity for planning effective control of whitefly by involving different agencies in the affected areas and educating the farmers. The future research should be directed towards the following points.

⇒ Systematic pest surveillance in different agro-climatic zones of mulberry are to be undertaken to study the distribution pattern of various species of whitefly and their seasonal incidence.

⇒ Screening high yielding mulberry varieties in endemic areas of various geographical regions for identifying tolerant/resistant varieties.

⇒ Identifying native natural enemies specific to spiralling whitefly, standardizing mass production technique and testing their efficacy in the field have to be carried out as biological control is well-proven as "*Living weapon*" over chemical control.

⇒ Identifying effective newer molecule of insecticides to manage the pest.

⇒ An IPM strategy with bio-agents, botanicals, traps need to be formulated to keep the whitefly population below the economic injury level.

REFERENCES

- AHAMED C.A.A., NARAYANASWAMY K.C., RAMEGOWDA T., CHANDRAKALA M.V. (1999) Impact of feeding spiralling whitefly affected mulberry leaf on nutritional parameters and cocoon conversion efficiency in the silkworm, *Bombyx mori* L. during fifth instar. Mysore Journal of Agricultural Sciences, 33: 355-360.
- AKINLOSOTU T.A., JACKAI L.E.N., NTONIFOR N.N., HASSAN A.T., AGYAKWA C.W., ODEBIYI J.A., AKINGBOHUNGBE A.E., ROSSEL H.W. (1993) Spiralling whitefly *Aleurodicus dispersus* in Nigeria. FAO Plant Protection Bulletin, 41: 127-129.
- ANONYMOUS (1981) Successful control of spiraling whitefly with *Encarsia haitiensis*. Hawaii pest report, 1(5): 1-10.
- ASIYA MARIAM M.A. (1999) Biology and management of spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera: Aleyrodidae) on mulberry. M.Sc. (Ag.) Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 88 pp.
- BANDYOPADHYAY U.K., SANTHA KUMAR M.V. (2000) Whitefly, *Dialeuropora decempunctata* – A new challenge to sericulturists. Indian silk, 39 (6) : 10 - 12.
- DAVID B.V., REGU K. (1995) *Aleurodicus dispersus* Russell (Aleyrodidae: Homoptera) - A whitefly pest new to India. Pestology, 19(3): 5-7.
- DOURESSAMY S., CHANDRAMOHAN N., SIVAPRAKASAM N., SUBRAMANIAM A., SUNDARABABU P.C. (1997) Management of spiralling whitefly. Indian Silk, 18(2) : 15-16.
- FIRMAN I.D. (1982) Plant protection news. Noumea, New Caledonia; South Pacific Commission, Information Circular No. 90, 8 pp.

- GEETHA B., LOGANATHAN M., SWAMIAPPAN M. (1998) Record of spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell in Tamil Nadu. Insect Environment, 4: 55.
- JAGADISH K.S., NARAYANASWAMY K.C., JAYARAMAIAH M., RAMAKRISHNA NAIKA, GOVINDAN R., NAGARAJAIAH C. (2004) Seasonal incidence, host range and spatial distribution of spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell infesting mulberry. Progress of Research on Disease and Pest Management in Sericulture (Eds Govindan R., Ramakrishna Naika and Sannappa B), Seri Scientific Publishers, Bangalore, pp. 82 – 85.
- KAJITA H., SAMUDRA M., WATTO A. (1991) Discovery of the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera : Aleyrodidae) from Indonesia with notes on its host plants and natural enemies. Applied Entomology and Zoology, 26(3): 397-400.
- KAVITHA KIRUBAVATHY, SARANYAMARIAMMANINAN (1999) Neem for the management of whiteflies on mulberry. National symposium on Biological Control of Insects in Agrl., Forestry, Medicine and Veterinary Science. 21-22, Jan. 1999, Abstracts and Souvenir, Department of Zoology, Bharathiar University, Coimbatore, 98 p.
- KHAN M.A., PANDEY R.K., ANIL DHAR (2004) Incidence of whitefly in Jammu and Kashmir. Indian Silk, 43 (2) : 6.
- KOTIKAL K. (1982) Studies on the pests of mulberry, *Morus alba* L. with special reference to Bihar hairy caterpillar, *Spilosoma obliqua* Walker (Lepidoptera : Arctiidae). M.Sc. (Ag.) Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore, p.73.
- LOPEZ V.F., KAIRO M.T.K., CARL K.P. (1997) Strengthening of the biological control programme against the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* in Togo. Curepe, Trinidad and Tobago; International Institute of Biological Control, Technical Report, 70 pp.
- MAHADEVA A., SHREE M.P. (2003) Effect of feeding spiralling whitefly (*Aleurodicus dispersus* Russell) infested mulberry leaves on the nutritional efficiency and economic parameters of silkworm (*Bombyx mori* L.). National Seminar on Disease and Pest Management in Sericulture, (Abstract) Sept. 2003, Sericulture College, University of Agricultural Sciences, Chintamani, p. 21.
- MANI M., KRISHNAMOORTHY A. (1997) Bionomics and biological control of spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Aleyrodidae : Homoptera). Insect Environment, 6 : 18 - 21.
- MANI M., KRISHNAMOORTHY A. (2000) Population dynamics of spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Aleyrodidae, Homoptera) and its natural enemies in India. Entomon, 25: 29-34.
- MANI M., KRISHNAMOORTHY A., DINESH M.S. (2000) Biological control studies on the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera: Aleyrodidae). Entomocongress 2000 – Perspectives for the New Millennium, (Abstracts) 5-8 November 2000, Association for Advancement of Entomology, Trivandrum, pp.37-38.
- MARTIN, J.H. (1990) The whitefly species *Aleurodicus dispersus* and its rapid extension of range across the Pacific and South East Asia. MAPPS Newsletter. 14: 36-37.
- MEGIR-GUMBEEK (1987) Study on control of whitefly. Annual Report Research Branch Department of Agriculture for the year 1986-87. pp 83-84.
- MOUND L.A. (1962) Studies on the olfaction and colour sensitivity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera : Aleyrodidae). Entomologia Experimentalis et Applicata, 5: 99-104.
- NAKAHARA L. (1978) The host plants of spiraling whitefly. Hawaii Co-operative Economic Pest Report. State of Hawaii, 61 p.
- NARAYANASWAMY K.C., RAMEGOWDA T. (1999) Incidence of spiralling whitefly on mulberry. Insect Environment, 5: 128-129.
- NARAYANASWAMY K.C., RAMEGOWDA T., RAGHURAMAN R., MANJUNATH M.S. (1999) Biochemical changes in spiralling whitefly (*Aleurodicus dispersus*) infested mulberry leaf and their influence on some economic parameters of silkworm (*Bombyx mori*). Entomon, 24: 215-220.
- NARENDRA KUMAR J.B., MAGADAM S.B., KAMBLE C.K., DANDIN S.B. (2004) Integrated management of spiralling whitefly. Indian Silk, 43 (2) : 5 – 7.

- PALANISWAMI M.S., PILLAI K.S., NAIR R.R., MOHANDAS C. (1995) A new cassava pest in India. *Cassava News Letter*, 19: 6-7.
- PAULSON G.S., KUMASHIRO B.R. (1985) Hawaiian Aleyrodidae. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 25: 103-129.
- PRATHAPAN K.D. (1996) Outbreak of the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Aleyrodidae : Homoptera) in Kerala. *Insect Environment*, 2: 36-37.
- RAJAGOPAL REDDY C., DHARMA REDDY K., RAJASEKHAR REDDY P., LAXMI REDDY P. (2001) Whitefly incidence on mulberry in Andhra Pradesh. *Indian Silk*, 40 (6) : 9– 10.
- RAMANI S. (2000) Fortuitous introduction of an aphelinid parasitoid of the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera: Aleyrodidae) into the Lakshadweep islands, with notes on host plants and other natural enemies. *Journal of Biological Control*, 14: 55-60.
- RANJITH, A.M., SITARAMA RAO D., THOMAS J.M. (1996) New host records of the mealy whitefly, *Aleurodicus dispersus* (Russell) in Kerala. *Insect Environment*, 2: 35-36.
- RUSSELL L.M. (1965) A new species of *Aleurodicus douglas* and two close relatives (Homoptera : Aleyrodidae). *Florida Entomologist*, 48: 47-55.
- SATHE T.V., MULLA M.K., GAJENDRA ARBALLI, RUPALI PAWAR (1999) Whitefly – A new pest of mulberry. *Indian Silk*, 37 (11) : 10.
- SCANLAN F.M. (1995) Fruit Production Manual. Dhaka, Bangladesh; Development of Agricultural Extension, Bangladesh Agricultural Development Corporation, pp 116-117.
- SENGUTTUVAN K., DOURESSAMY S., SUBRAMANIAN A. (2001) Extent of damage of spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Aleyrodidae : Homoptera) infested mulberry leaves on different host plants in Tamil Nadu. *National Seminar on Emerging Trends in Pests and Diseases and their Management*, (Abstract) Oct. 2001, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, p. 194.
- SRINIVASA M.V., VIRAKTAMATH C.A., REDDY C. (1999) A new parasitoid of the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera: Aleyrodidae) in South India. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 5: 59-61.
- WATERHOUSE D.F., NORRIS K.R. (1989) Biological control. Pacific prospects supplement. *ACIAR Monograph*, No. 12, 125 p.
- WEN HUNG CHICH, HSU-TUNG CHING, HEN-HIOUNAN, CHEN C.N. (1994) Supplementary description and host plants of the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell. *Chinese Journal of Entomology*, 14: 147-161.
- WIJESEKERA G.A.W., KUDAGAMAGE C. (1990) Life history and control of spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* (Homoptera : Aleyrodidae). Fast spreading pest in Sri Lanka. 22-25 *Quarterly Newsletter - Asia and Pacific Plant Protection Commission*, 33: 22-24.

LA MOUCHE BLANCHE A PONTE EN SPIRALE, *ALEURODICUS DISPERSUS* (RUSSEL) SUR LE MURIER ET LES PRATIQUES POUR LUTTER CONTRE ELLE

K. A. MURUGESH

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

*Le mûrier (*Morus* spp.) est sujet à des infestations par plus de 300 insectes nuisibles, parmi lesquels l'aleurode à ponte en spirale, *Aleurodicus dispersus* (Russel), un insecte nuisible fondamental sur les cultures horticoles a gagné en notoriété au cours de ces quatre à cinq dernières années dans les zones séricicoles du sud de l'Inde. L'insecte nuisible a plus de 140 plantes hôtes. Il entraîne une perte moyenne de rendement foliaire de 21 %, avec une incidence de plus de 58 % chez le mûrier et les dégâts sont importants pendant les mois d'été. Les lésions entraînent la phytotoxémie qui provoque le froissement et la chute prématurée des feuilles, avec une infestation de moisissure charbonneuse. Non seulement le matériau blanc sécrété par les jeunes mouches abîme les plantes cultivées, mais il se propage également par le vent et entraîne des gènes. Les génotypes de mûrier S39 et China White s'avèrent modérément résistants à l'aleurode à ponte en spirale.*

INTRODUCTION

En Inde, le mûrier est cultivé sur environ 0,217 millions d'hectares, couvrant 23 Etats. La culture est sujette à l'attaque en proportions variables par différents organismes en raison de sa croissance rapide et de son feuillage vert pendant toute l'année soit comme abri, soit comme nourriture ou bien les deux. Jusqu'à présent, on sait que 300 espèces de nuisibles insectes et non insectes infestent le mûrier à des intensités variables pendant différentes étapes de sa croissance et différentes saisons (Kotikal, 1980). Le mûrier est sensible à un vaste ensemble de systèmes d'insectes nuisibles dont un grand nombre d'insectes nuisibles suceurs comme l'insecte à écailles, la cicadelle, les cochenilles, les thrips, les mites, etc... Les aleurodes, connus couramment sous le nom de mouches blanches sont de petits insectes phytophages qui passent inaperçus, souvent négligés malgré leur abondance. Le nom de mouche blanche est tiré de l'apparence plus blanche des adultes et de leur tendance à voler facilement quand on les dérange. Les adultes ont une paire d'ailes enfarinées qui sont en général blanches avec quelques nervures. Habituellement, les pupariums sécrètent une cire avec une iridescence bleue distincte, avec des fils individuels ressemblants à de minuscules fibres de verre. Récemment, la mouche blanche à ponte en spirale du mûrier, *Aleurodicus dispersus* (Russell) (Homoptère : Aleyrodidae), un insecte nuisible fondamental chez de nombreuses cultures horticoles dans différentes parties du globe a gagné une notoriété considérable au cours des quatre à cinq dernières années dans toutes les zones séricicoles traditionnelles des Etats du sud de l'Inde. Dans ce contexte, il est impératif d'acquérir plus de connaissances sur cet insecte nuisible majeur. Dans cet article, nous passons donc en revue la distribution de l'insecte nuisible, sa biologie, ses plantes hôtes, les symptômes de ses dégâts, sa dynamique de population, la réaction des génotypes de mûrier à la mouche blanche à ponte en spirale, les changements biochimiques de la feuille de mûrier, l'effet des feuilles atteintes sur les caractères économiques du cocon, les ennemis naturels et les stratégies de lutte.

DISTRIBUTION

A. dispersus est un insecte nuisible très polyphage natif des Caraïbes et de l'Amérique Centrale (Russel, 1965). Il a été introduit et a pris son statut d'insecte nuisible dans les îles Canaries en 1962 et à Hawaï en 1978 (Pauslon et Kumashiro, 1985), dans les Samoa américaines et à Guam en 1981 (Firman, 1982) et dans les îles Pacifiques (Waterhouse et Norris, 1989). Plus tard la mouche blanche s'est propagée vers l'ouest dans plusieurs zones y compris en Afrique (Akinlosotu et coll., 1993) et en Asie (Wijesekera et Kudagamage, 1990 ; Kajita et coll., 1991 ; Wen Hung Chich et coll., 1994). Par la suite, on l'a rapporté au Ghana, au Congo, au Brésil, à Cuba, aux Philippines, à Taïwan et dans d'autres pays (Narendra Kumar et coll., 2004).

Dans l'Asie du Sud, il est présent aux Maldives (Martin, 1990), au Sri Lanka (Wijesekera et Kudagamage, 1990), au Bangladesh (Scanlan, 1995) et en Inde (Palaniswami et coll., 1995). On l'a rapporté en Inde pour la première fois en 1993 dans le Kerala (Palaniswami et coll., 1995) et plus tard dans d'autres parties de la péninsule indienne (David et Regu, 1995 ; Prathapan, 1996 ; Geetha et coll., 1998 ; Sathe) et dans les îles Lakshadweep (Ramani, 2000).

BIOLOGIE

On a rapporté que la période d'incubation des œufs de l'aleurode à ponte en spirale varie de sept à dix jours (Wijesekera et Kudagamage, 1990), de neuf à onze jours (Waterhouse et Norris, 1989) et de quatre à six jours en Inde (Douressamy et coll., 1997). La durée du deuxième âge varie de quatre à cinq jours, le troisième âge dure cinq à sept jours et le quatrième âge dure de 10 à 11 jours (Waterhouse et Norris, 1989). Douressamy et coll., (1997) ont rapporté que la durée nymphale complète de l'aleurode à ponte en spirale dure de 14 à 21 jours, la durée pupale de deux à trois jours et le cycle de vie total de 21 à 32 jours. Le cycle de vie total de l'aleurode à ponte en spirale dure de 26 à 36 jours (Wijesekera et Kudagamage, 1990). Les femelles pondent pendant toute leur durée de vie et commencent un jour après l'émergence. Les femelles accouplées produisent une descendance des deux sexes, tandis que les femelles non accouplées produisent seulement une descendance mâle (Waterhouse et Norris, 1989).

La durée larvaire de chaque âge sur le mûrier est de $5,3 \pm 0,9$; $6,3 \pm 0,43$; $5,2 \pm 0,4$; $3,5 \pm 0,54$ jours par comparaison à une durée de $7,2 \pm 0,6$; $7,6 \pm 0,71$; $8,1 \pm 0,54$ et $5,5 \pm 0,5$ jours respectivement pour le 1^{er}, le 2^{ème}, le 3^{ème} et le 4^{ème} âge sur des plants en pot. La durée nymphale totale de l'aleurode à ponte en spirale sur le mûrier s'achève en $16,8 \pm 2,8$ jours et en $28,2 \pm 2,4$ jours chez des plants en pot. Le cycle de vie total et la longévité adulte de l'aleurode à ponte en spirale sur un plant de mûrier de type arbre sont de respectivement $25,0 \pm 5,1$ et $15,7 \pm 2,42$ jours. Tandis que chez la mouche blanche élevée sur un plant de mûrier en pot ils sont respectivement de $35,5 \pm 4,05$ et $14,2 \pm 3,51$ jours (Asiya Mariam, 1999).

PLANTES HOTES

A. dispersus, étant un insecte nuisible polyphage, on sait qu'il attaque un grand nombre de plantes dans différents pays où l'insecte nuisible a été introduit. On l'a pour la première fois recueilli sur un cocotier en Floride (Russel, 1965). On a rapporté jusqu'à 44 plantes hôtes en Floride, en Amérique centrale et du sud et dans les Caraïbes (Russel, 1965), 100 à Hawaï (Nakahara, 1968), 60 à Sarawak (Megir-Gumbek, 1987), 27 à Kiribati (Waterhouse et Norris, 1989), 22 en Indonésie (Kajita et coll., 1991) et 144 à Taiwan (Wen Hung Chich et coll., 1994) pour la mouche blanche à ponte en spirale. En Inde, David et Regu (1995) ont recueilli l'insecte nuisible sur le tapioca sauvage et l'hévéa sauvage et plus tard on l'a enregistré chez 70 (Prathapan, 1996), 22 (Ranjith et coll., 1996), 45 (Mani et Krishnamoorthy, 1997), 27 (Douressamy et coll., 1997) et 140 (Narendra Kumar et coll., 2004)

plantes. David et Regu (1995) ont répertorié 19 plantes hôtes de la mouche blanche à ponte en spirale et indiqué que le mûrier est l'un de ses hôtes préférés. Asiya Mariam (1999) a évalué 200 espèces de plantes par rapport à la mouche blanche à ponte en spirale et trouvé que 53 espèces subissent les dégâts de l'insecte nuisible avec des niveaux variables d'incidence c'est-à-dire faible (28 espèces), moyen (14 espèces) et élevé (11 espèces). Parmi les familles de plantes préférées, les Euphorbiacées présentent un niveau élevé de sensibilité à l'aleurode à ponte en spirale suivies par les Solanacées, les Fabacées, les Malvacées, les Astéracées et les Labiacées. Selon Senguttuvan (2001) environ 107 espèces de plantes sont attaquées par la mouche blanche à ponte en spirale. Parmi elles, 64 espèces enregistrent un faible niveau (25 % de dégâts sur les feuilles), 24 espèces enregistrent un niveau moyen (26 à 50 % de dégâts sur les feuilles) et 19 espèces enregistrent un niveau élevé de dégâts (50 % de dégâts sur les feuilles).

Une étude sur 18 hôtes alternatifs appartenant aux plantes horticoles, ornementales, aux arbres et aux mauvaises herbes a révélé que l'infestation est sévère chez le goyavier, le mûrier et les plantes de forêt telles que *Terminalia catappa* et *Tectona grandis* (Rajagopal Reddy et coll., 2001. Jagadish et coll., (2004) ont rapporté l'incidence de l'aleurode à ponte en spirale chez 16 espèces de plantes qui comprennent le papayer, l'*Hibiscus* spp., *Acalypha* spp., *Michelia champaca*, le goyavier, le manioc, le ricin, le mûrier, *Terminalia* spp., etc...

SYMPTOMES DES DEGATS

Chez le mûrier, les nymphes et les adultes sont principalement rassemblés sur la surface inférieure des feuilles (Douressamy et coll, 1997) et ils sucent la sève. L'infestation se répand généralement de bas en haut. La plupart du temps les jeunes feuilles abritent moins de masses d'œufs que les feuilles mûres. Les dégâts provoqués par la phytotoxémie associée avec la mouche blanche à ponte en spirale sont des mouchetures jaunâtres sur les feuilles, le froissement des feuilles et la chute prématurée des feuilles (Khan et coll., 2004).

L'aleurode à ponte en spirale (*Dialeuropora decempunctata*) suce la sève et entraîne la chlorose, la sécheresse des feuilles, l'enroulement de la feuille et la maladie de la moisissure charbonneuse chez le mûrier (Bandyopadhyay et Santha Kumar, 2000 ; Khan et coll., 2004). Les adultes et les nymphes se nourrissent tous les deux de la sève en la suçant, ce qui entraîne des mouchetures jaunâtres sur les feuilles. En quelques jours, l'infestation s'étend à presque toutes les feuilles et à distance il semble que la canopée est recouverte d'une substance poudreuse blanche. A un stade ultérieur, les feuilles deviennent brunâtres. Les adultes et les nymphes sécrètent une miellée (substance collante) sur laquelle la moisissure charbonneuse (champignon) se développe. Cela donne une apparence noire collante aux feuilles atteintes qui ne sont plus aptes à nourrir le ver à soie (Narendra Kumar et coll., 2004).

En plus des dégâts directs sur les différentes cultures, l'insecte nuisible entraîne aussi des effets néfastes indirects pour les êtres humains avec sa sécrétion cireuse. La matière blanche cireuse et floconneuse abondante se répand ailleurs avec le vent et entraîne des dommages importants.

DYNAMIQUE DE POPULATION

La mouche blanche est présente toute l'année dans les états du sud de l'Inde, avec une population élevée en été (mars-juin) et faible en hiver (octobre – janvier). La population est positivement corrélée avec la température et négativement corrélée avec l'humidité. Palaniswami et coll., (1995) ont rapporté une incidence sévère pendant la saison sèche après les pluies entre novembre et avril, avec un niveau faible en février au Kerala. Narayanaswamy et Ramegowda (1999) ont constaté une incidence élevée de l'insecte nuisible sur le mûrier en avril-juin au Karnataka. La population des

prédateurs indigènes demeure faible et n'a pas d'impact sur la mouche blanche (Mani et Krishnamoorthy, 2000).

REACTION DES GENOTYPES DE MURIER A LA MOUCHE BLANCHE A PONTE A SPIRALE

Les résultats sur les niveaux de population de la mouche blanche à ponte en spirale enregistrés sur une période 12 semaines montrent que la population adulte par feuille est inférieure à un par feuille chez les génotypes S708, Berhampur, BC 259, S46, China White, DD, S39, S1635 et C776, tandis que les génotypes S30, S40, S54, V1, C763 et C20 enregistrent un niveau modéré de population adulte (1 à 1,5). Les génotypes M5, E Triploid, Palladam Local, Kosen et S13 abritent plus de mouches blanches. La sensibilité / la réaction d'une variété cultivable à un insecte nuisible dépend des constituants morphologiques et chimiques, qui influencent le choix de l'hôte et le développement d'une espèce d'insecte nuisible. Le nombre de spirales est minimum chez S36, C763, China White, Palladam local S39, C7756 et S1 avec moins d'une spirale par feuille. Les génotypes S30, S708, Berhampur, BC259, S54, China White, DD, S1635 abritent 1 à 1,5 spirales, ce qui les classe dans le groupe modérément résistant. On enregistre une population plus importante de spirales chez M5, E Triploid et S13.

Une évaluation collective de la population adulte de l'aleurode à ponte en spirale et des spirales par feuille montre que les génotypes S39 et China White enregistrent une population minimum d'œufs et d'adultes contre un niveau de population plus élevé chez M5, R Triploid et S13. Il est intéressant de noter que certains génotypes comme Palladam Local et S36 qui sont attirants pour les mouches blanches adultes enregistrent moins d'œufs (Asiya Mariam, 1999).

CHANGEMENTS BIOCHIMIQUES DANS LES FEUILLES DE MURIER

Les feuilles de mûrier atteintes par la mouche blanche à ponte en spirale sont carencées en deux nutriments importants, les hydrates de carbone et les protéines. L'infestation par l'insecte nuisible entraîne une diminution radicale de l'humidité, de la chlorophylle a et b, des protéines brutes, des sucres, de l'azote, du phosphore, du calcium et du magnésium dans les feuilles de mûrier (Narayanaswamy et coll., 1999 ; Asiya Mariam, 1999).

IMPACT DE L'ALIMENTATION AVEC DES FEUILLES DE MURIER INFESTÉES PAR LA MOUCHE BLANCHE A PONTE EN SPIRALE SUR LES CARACTERES ECONOMIQUES DU VER A SOIE

On a constaté que l'alimentation des vers à soie avec des feuilles affectées par les insectes nuisibles interfère avec la physiologie de la nutrition et a un impact sur les caractères du cocon et on observe une réponse négative en matière de croissance du ver à soie et de rendement en cocons (Narayanaswamy et coll., 1999). On remarque un impact négatif, avec une durée larvaire plus longue, une diminution de la conversion et de l'utilisation de la nourriture et une diminution des paramètres économiques du cocon quand on nourrit le ver à soie avec des feuilles de mûrier infestées par la mouche blanche, à cause de la diminution des niveaux nutritifs chez les feuilles atteintes (Asiya Mariam, 1999 ; Ahamed et coll., 1999 ; Narayanaswamy et coll., 1999).

On remarque une diminution progressive du taux effectif d'élevage avec une augmentation du niveau des dégâts. Les feuilles avec 5, 10, 25, 50 et 75 % de dégâts donnent respectivement un taux effectif d'élevage de 82 ; 76,66 ; 68,66 et 62 %. L'alimentation des vers avec des feuilles atteintes à 100 % donne un taux effectif d'élevage de 53,3 %. L'alimentation avec des feuilles saines donne un taux effectif d'élevage de 86,66 % (Asiya Mariam, 1999). Les paramètres économiques, c'est-à-dire

le poids de la larve, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, la longueur du filament de soie et la dévidabilité sont affectés quand on nourrit les vers à soie avec des feuilles infestées par la mouche blanche à ponte en spirale (Mahadeva et Shree, 2003).

ENNEMIS NATURELS

Parasitoïdes :

A. dispersus est natif des Caraïbes et la majorité des ennemis naturels rapportés sur *A. dispersus* proviennent des Antilles. Bien qu'on ait enregistré plusieurs espèces de parasites et de prédateurs sur la mouche blanche à ponte en spirale, le parasite aphelinidé, *Encarsia haitiensis* s'avère prometteur dans toutes les îles. On a rapporté une lutte réussie contre la mouche blanche à ponte en spirale trois mois après la libération d'adultes d'*E. haitiensis* dans les îles Lanai (Anonyme, 1981). On a observé des niveaux de parasitisme de 30 à 68 % avec les deux parasitoïdes dans différentes parties de l'Inde de janvier à juin 2000 et là où le parasitisme est élevé, cela diminue considérablement la population d'insectes nuisibles (Mani et coll., 2000). On constate que les niveaux de parasitisme dépendent fortement de la densité et varient aussi en fonction des plantes hôtes (Srinivasa et coll., 1999 ; Ramani, 2000). L'insecte nuisible est aussi attaqué par les hyperparasitoïdes, *Prospaltella divergens* Siv. et *E. merceti* Silv. (Eulophidae) qui contribuent à diminuer la population d'insectes nuisibles (Sathe et coll., 1999). Il n'y a pas encore eu de rapports sur le comportement parasite et sur le degré de parasitisme dans la régulation de la population de la mouche blanche.

Prédateurs :

A côté du parasite aphelinidé, on a trouvé trois prédateurs coccinellidés qui sont importants contre *A. dispersus* (Waterhouse et Norris, 1989). Lopez et coll., (1997) ont trouvé trois espèces du coccinellidé, *Nephaspis* et un certain nombre de prédateurs généralistes y compris les syrphes, les chrysopes, les araignées et les fourmis dont la proie est la mouche blanche. Une étude sur la présence d'ennemis naturels de la mouche blanche sur le mûrier a révélé l'association de prédateurs plutôt que de parasitoïdes. On a enregistré cinq coccinellidés dans un échantillonnage de terrain. Parmi les coccinellidés, la population d'*A. puttarudriahi* est la plus élevée suivie par *C. montrouzieri* (Asiya Mariam, 1999). Lorsqu'on encourage la multiplication de la population des ennemis naturels, c'est-à-dire, *Chilocorus nigrata* F., *C. montrouzieri*, *Apertochrysa* sp., *M. boninensis*, *M. astur* et *Chrysoperla carnea*, on constate que cela diminue la population / la densité de la population de la mouche blanche à ponte en spirale chez le mûrier (Rajagopal Reddy et coll., 2001). La multiplication en masse et la libération en masse des coléoptères coccinelles prédateurs *C. montrouzieri* et *S. coccivora* connus pour se nourrir de tous les stades de la mouche blanche en spirale et l'encouragement de la prolifération des coléoptères coccinelles *M. sexmaculatus* et *C. nigrata*, qui sont disponibles en abondance dans les muraies dans un environnement non toxique s'avère réussir pour lutter contre la population de la mouche blanche en spirale (Narendra Kumar et coll., 2004).

STRATEGIES DE LUTTE

Puisque *A. dispersus* est un insecte nuisible exotique, très peu de recherches ont été entreprises en Inde sur les méthodes de lutte. L'application d'un insecticide chimique seul ne suffit pas à lutter contre la mouche blanche à ponte en spirale, en raison de la couche cireuse qui recouvre l'insecte, le produit chimique pourrait ne pas atteindre le site ciblé et il est donc nécessaire d'avoir recours à des pratiques de lutte intégrée contre l'insecte nuisible (IPM). Les chercheurs sur les aleyrodidae ont commencé à mettre au point différentes pratiques de lutte pour éliminer l'insecte nuisible, qui comprennent des méthodes mécaniques, physiques et chimiques.

Méthodes physiques et mécaniques :

La vaporisation de savon Rosin à l'huile de poisson (FORS) à 4 % au début de la matinée minimise l'incidence de la mouche blanche à ponte en spirale (Douressamy et coll., 1997). La lutte contre cet insecte nuisible implique le recueil et la destruction des feuilles de mûrier avec des masses d'œufs, des nymphes et des adultes (Douressamy et coll., 1997) et la vaporisation d'eau avec un jet puissant à raison de 12 l / minute tous les deux jours diminue radicalement l'intensité de l'insecte nuisible (Narendra Kumar et coll., 2004).

Pièges et prise au piège :

Plusieurs types de pièges ont été conçus d'après la réponse caractéristique de différentes espèces de mouche blanches et on les utilise pour contrôler l'insecte nuisible (Mound, 1962). On a suggéré la mise en place de pièges jaunes collants à raison de 10 / 4000 m² pour attirer les adultes et pour contrôler l'insecte nuisible (Douressamy et coll., 1997 ; Narendra Kumar et coll., 2004). On a étudié l'efficacité de pièges légers contre la mouche blanche à ponte en spirale. On attrape plus d'adultes toutes les deux heures tôt le matin, c'est-à-dire entre 4 et 6 heures et ils représentent 97,9 % de la prise totale (Asiya Mariam, 1999).

Méthodes chimiques et botaniques :

La lutte chimique est à la fois coûteuse et peu pratique en raison du vaste ensemble d'hôtes de l'insecte nuisible, de sa distribution étendue et de sa présence dans des zones à densité de population humaine élevée (Kajita et coll., 1991). Cependant, on a évalué plusieurs insecticides synthétiques chimiques et non chimiques (botaniques) pour lutter contre *A. dispersus*. Kavitha Kirubavathy et Saranyamariammaninan (1999) ont observé que les produits à base de margousier sont des formulations efficaces pour lutter contre la mouche blanche à ponte en spirale. L'application d'huile de margousier à 2 et 3 % et de l'extrait de l'amande du noyau à 2 % (NSKE) s'avère efficace pour éliminer la population adulte de la mouche blanche. Pour lutter contre la population nymphale on a rapporté que 2 à 3 % d'huile de margousier, 3 % de NSKE et 2 % d'huile de margousier + NSKE sont prometteurs. On a testé l'action ovicide de différents insecticides contre la mouche blanche à ponte en spirale. Parmi les insecticides chimiques, le dichlorvos enregistre une mortalité ovicide de 89,38 %, suivie par le malathion et le phosalone. Parmi les insecticides biologiques, l'huile de margousier, l'huile d'amande du noyau de margousier et l'huile de pongamia enregistrent une mortalité de respectivement 52,08 ; 53,56 et 59,27 % (Asiya Mariam, 1999). On n'enregistre aucune infestation par l'insecte nuisible quand on vaporise le mûrier avec de l'huile de margousier à 0,5 % (Rajagopal Reddy et coll., 2001) et à 1 % (Bandyopadhyay et Santha Kumar, 2000 ; Khan et coll., 2004). On a constaté que la vaporisation avec du dichlorvos à 0,038 % sur les parties affectées des plants a un effet mortel sur tous les stades de la mouche blanche à ponte en spirale (Narendra Kumar et coll., 2004).

PERSPECTIVES

On a récemment rapporté l'incidence de la mouche blanche, jusqu'ici connue principalement sur les cultures horticoles, chez le mûrier dans différentes parties du pays. Sa propagation rapide, son potentiel d'attaque et la sévérité des dégâts pour la plante sont préoccupants. A l'avenir, elle pourrait bien devenir un nouvel insecte nuisible majeur sur le plan économique. Il est donc nécessaire de planifier efficacement la lutte contre la mouche blanche en impliquant différentes organisations dans les zones atteintes et en éduquant les fermiers. A l'avenir la recherche devrait s'orienter dans les directions suivantes :

⇒ Il faut entreprendre une surveillance systématique de l'insecte nuisible dans les différentes zones agro-climatiques du mûrier pour étudier le modèle de distribution des différentes espèces de la mouche blanche et leur incidence saisonnière.

⇒ Evaluation des variétés de mûrier à rendement élevé dans les zones endémiques dans différentes régions géographiques pour identifier les variétés tolérantes / résistantes.

⇒ Il faut procéder à l'identification des ennemis naturels indigènes spécifiques à la mouche blanche à ponte en spirale, à la standardisation de techniques de production en masse et au test de leur efficacité sur le terrain puisqu'il a été bien prouvé que la lutte biologique est une « *arme vivante* » par rapport à la lutte chimique.

⇒ Identifier de nouvelles molécules insecticides efficaces pour lutter contre l'insecte nuisible.

⇒ Il faut formuler une stratégie IPM avec des agents biologiques, botaniques, des pièges pour conserver la population de la mouche blanche en dessous du seuil de préjudice économique

RELATIVE SUSCEPTIBILITY OF CROSS BREEDS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. TO NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS AND BOTANICAL BASED VIRUS MANAGEMENT

H. V. RAMESH KUMAR, K. A. MURUGESH, C. A. MAHALINGAM,
N. CHANDRAMOHAN AND P. MOHANRAJ

Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore - 03, India.

An investigation was conducted to know the relative susceptibility of silkworm cross breeds to BmNPV and to evaluate botanical based TNAU (Tamil Nadu Agricultural University) bed disinfectants for grasserie management. All the cross breeds were found to be susceptible to BmNPV infection significantly as the dose of BmNPV increased from 10^5 to 10^9 POB/ml. However, the level of susceptibility differed among the cross breeds tested. The maximum LC_{50} value of 9.52×10^6 POB/ml was recorded in $APM_1 \times APS_8$ followed by 2.17×10^6 POB/ml in $PM \times CSR_2$ and 1.36×10^6 POB/ml in $PM \times NB_4D_2$, indicates that these three breeds were comparatively less susceptible than all other cross breeds. Among the bed disinfectants evaluated, TNAU formulation (2) was found to be highly effective in managing the grasserie by bringing down the larval mortality to 20.75 per cent from 45.50 per cent in infected control. The application of TNAU formulation (2) also significantly increased the economic characters of silkworm as well as cocoon yield (10.68 kg/ 10000 larvae) over all other bed disinfectants.

Keywords: BmNPV, susceptibility, crossbreeds, bed disinfectant, management, economic parameters

INTRODUCTION

The outbreak of diseases and crop failures in silkworm rearing are common under tropical countries. Mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. is affected by a number of diseases caused by viruses, bacteria, fungi and protozoa, and among the silkworm diseases, grasserie caused by *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) is one of the most serious diseases in tropical countries and occurs throughout the year. The cocoon yield loss due to grasserie ranged from 22.5 per cent (Sivaprakasam, 1994) to 40 per cent (Vaidya, 1960). Several workers studied the relative susceptibility of pure races of silkworm to BmNPV (Liushixian, 1984; Krishna *et al.*, 1992; Sivaprakasam and Rabindra, 1997) whereas the report on susceptibility of silkworm cross breeds is very limited (Nataraju, 1995; Venkatesh, 2000). Though different management practices (Ueda *et al.*, 1955; Sivaprakasam and Rabindra, 1996; Venkata Reddy *et al.*, 1990) are employed against BmNPV, the viral menace is prevailing. Hence, the study was carried out to explore the susceptibility level of different silkworm cross breeds to BmNPV and to evaluate the bioefficacy of bed disinfectants formulated by TNAU against BmNPV.

MATERIALS AND METHODS

1. Relative susceptibility of silkworm cross breeds to *BmNPV*:

BmNPV was isolated from grasserie infected fifth instar silkworms and purified stock suspension was maintained in refrigerator. The number of polyhedra was counted using a Neubauer haemocytometer in a phase contrast microscope. From the stock culture suspension five doses of *BmNPV* viz., 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 and 10^9 POBs/ml were prepared for the experiment by serial dilution. Disease Free Layings (DFLs) of two cross breeds, PM × APS₈ and APM₁ × APS₈ were obtained from the Andhra Pradesh State Sericulture Research and Development Institute (APSSR&DI), Hindupur, Andhra Pradesh and five cross breeds, PM × NB₄D₂, BL₂₃ × NB₄D₂, BL₂₄ × NB₄D₂, P₂D₁ × NB₄D₂ and MY₁ × NB₄D₂ were obtained from Central Sericultural Research and Training Institute (CSR&TI), Mysore, Karnataka. Along with these races, PM × CSR₂ was also taken up for rearing as standard check. Silkworm rearing techniques were adopted as described by Krishnaswami *et al.* (1973). The experiment was carried out in a Complete Randomized Design (CRD) with three replications for each treatment. *BmNPV* suspension was given to the larvae by leaf disc method (Sugumori *et al.*, 1990) by feeding the silkworms with virus suspension smeared mulberry leaves, soon after the second moult. Subsequent feedings for virus treated batches were given with uncontaminated leaves. Control batches were fed with the normal mulberry leaves. The data on larval mortality was collected and subjected to probit analysis as per Reed-Muench method to know the relative susceptibility (Finney, 1971).

2. Bioefficacy of bed disinfectants against *BmNPV*:

Two botanical based bed disinfectants viz., TNAU formulation (1) and TNAU formulation (2) (Manimegalai, 2003) and three lime based commercially available bed disinfectants, Vijetha, Resham Jyothi and Sanjeevini were evaluated for *BmNPV* management. The silkworm cross breed, PM × CSR₂ was taken up for the bioassay. Four replications with 100 larvae each were maintained in a Complete Randomized Design. Prior to commencement of rearing programme the experimental rearing trays were sprayed with 10^9 POBs/ml of *BmNPV* suspension by using hand sprayer. Two controls viz., control (infected), and control (un-infected) were maintained. After each moult and on fourth day of fifth instar, the bed disinfectants were dusted @ 4 kg /100 dfls using a puff duster (Sivaprakasam and Rabindra, 1996). The experimental data on biological and yield related parameters were recorded and analyzed with statistical procedure followed by Panse and Sukhatme (1957).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Effects of graded doses of *BmNPV* on larval mortality (%):

All the evaluated cross breeds were found to be susceptible to *BmNPV* infection significantly as the dose of *BmNPV* infection increased from 10^5 to 10^9 POB/ml. Among the cross breeds, maximum larval mortality of 52.44 per cent was registered in P₂D₁ × NB₄D₂ followed by 48.40 per cent in BL₂₄ × NB₄D₂ and 47.11 per cent in PM × APS₈, whereas the minimum larval mortality of 41.77 per cent was registered in APM₁ × APS₈ followed by 44.44 per cent in PM × NB₄D₂ and 44.88 per cent in PM × CSR₂ (Table I).

The results indicate that, among the evaluated cross breeds, P₂D₁ × NB₄D₂, BL₂₄ × NB₄D₂ and PM × APS₈ were found to be highly susceptible breeds to *BmNPV* infection, whereas the breeds, APM₁ × APS₈, PM × NB₄D₂ and PM × CSR₂ were found to be less susceptible. The present observations are in agreement with the earlier findings of White Lock (1977), who observed that larval mortality was found to be more rapid as dosage of NPV increased in *Heliothis armigera*. Venkatesh (2000) also reported that PM × NB₄D₂ was tolerant to *BmNPV*.

Table I. Effect of graded doses of BmNPV on larval mortality among cross breeds.

Tableau I. Effet de doses progressives de BmNPV sur la mortalité larvaire parmi les croisements.

Dose POBs / ml	Larval mortality (%) / Mortalité larvaire (%)							
	Silkworm races / Races de ver à soie							
	PM × APS ₈	APM × APS ₈	PM × CSR ₂	PM × NB4D ₂	BL ₂₃ × NB4D ₂	BL ₂₄ × NB4D ₂	P ₂ D ₁ × NB4D ₂ ²	MY ₁ × NB4D ₂
								Mean / Moyenne
10⁵	45.33 (42.31)	37.33 (37.65)	40.00 (39.21)	45.33 (42.32)	48.00 (43.85)	49.33 (44.61)	54.66 (47.68)	45.33 (42.31)
10⁶	50.66 (45.38)	44.00 (41.54)	49.33 (44.61)	49.33 (44.61)	54.66 (47.68)	53.33 (46.91)	58.66 (49.99)	52.00 (46.14)
10⁷	52.00 (46.15)	50.66 (45.38)	56.00 (48.45)	54.66 (48.45)	54.66 (47.68)	53.33 (46.91)	61.33 (51.55)	54.66 (47.68)
10⁸	64.00 (53.15)	56.00 (48.45)	60.00 (50.78)	56.00 (48.45)	58.66 (49.99)	62.66 (52.34)	68.00 (55.57)	58.66 (49.99)
10⁹	70.66 (57.21)	62.66 (52.34)	64.00 (53.13)	61.33 (53.13)	65.33 (53.98)	72.00 (58.09)	73.33 (59.08)	65.33 (53.93)
Control Témoin	0.00 (0.57)	0.00 (0.57)	0.00 (0.57)	0.00 (0.57)	0.00 (0.57)	0.00 (0.57)	0.00 (0.57)	0.00 (0.57)
Mean Moyenne	47.11 (40.79)	41.77 (37.66)	44.88 (39.46)	44.44 (39.20)	46.88 (40.62)	48.40 (41.57)	52.44 (49.31)	46.00 (40.10)
Between races (R) / Entre les races (R)				SEm± 0.61	C.D. at 5% 1.21			
Between doses (D) / Entre les doses (D)				0.53	1.05			
Interaction (R × D)				0.50	2.98			

Data in parentheses are arc sin transformed values. / Les données entre parenthèses sont les valeurs arc sinus transformées.

Table II. Probit response for larval dosage mortality of different cross breeds to BmNPV.

Tableau II. Réponse Probit pour le dosage de la mortalité due à BmNPV chez les larves des différents croisements.

Races	Chi square	Slope	Intercept	CL50 POB / ml	Fiducial limits	
	$\chi^2 (n-2)$	'b' $\pm$ SE	a		Lower	Upper
	<i>Chi carré</i>	<i>Pente</i>			<i>Limites fiducielles</i>	
	$\chi^2 (n-2)$	'b' $\pm$ SE			<i>Inférieure</i>	<i>Supérieure</i>
APM ₁ $\times$ APS ₈	0.019	0.159 $\pm$ 0.046	1.112	9.52×10^6	9.75×10^5	8.87×10^7
PM $\times$ CSR ₂	0.387	0.149 $\pm$ 0.046	0.947	2.17×10^6	5.13×10^5	1.60×10^7
PM $\times$ NB4D ₂	0.103	0.097 $\pm$ 0.046	0.600	1.36×10^6	4.68×10^5	3.41×10^7
PM $\times$ APS ₈	0.889	0.165 $\pm$ 0.046	0.988	9.47×10^5	2.08×10^4	5.78×10^6
MY ₁ $\times$ NB4D ₂	0.157	0.119 $\pm$ 0.046	0.700	7.68×10^5	5.81×10^4	9.13×10^6
BL ₂₄ $\times$ NB4D ₂	1.302	0.142 $\pm$ 0.046	0.784	3.32×10^5	3.31×10^4	3.02×10^6
BL ₂₃ $\times$ NB4D ₂	0.287	0.098 $\pm$ 0.046	0.525	2.08×10^5	3.13×10^4	4.46×10^6
P ₂ D ₁ $\times$ NB4D ₂	0.134	0.117 $\pm$ 0.046	0.488	1.42×10^4	3.26×10^3	4.51×10^5

* All lines significantly a goodness of fit ≤ 0.999 .* Toutes les lignes ont une correction d'ajustement significativement $\leq 0,999$.

Table III. Bioefficacy of different bed disinfectants against *BmNPV* and its influence on the economic parameters of silkworm cross breed.

*Tableau III. Bioefficacité de différents désinfectants de litière contre *BmNPV* et influence sur les paramètres économiques des croisements de ver à soie.*

Treatments	Economic parameters								
	Larval mortality (%)	Fifth instar larval duration (h)	Larval weight (g)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)	Silk productivity (cg)	Cocoon yield by weight / 10000 larvae	Cocoon yield by number / 10000 larvae
Traitements	Paramètres économiques								
	Mortalité larvaire (%)	Durée du 5 ^{ème} âge larvaire (h)	Poids larvaire (g)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Productivité de la soie (cg)	Rendement en cocons au poids / 10 000 larves	Rendement en cocons en nbre / 10 000 larves
TNAU formulation (1) <i>Formulation TNAU (1)</i>	36.75 (37.31)	198.00	2.51	1.31	0.18	13.74	2.18	8.32	6327
TNAU formulation (2) <i>Formulation TNAU (2)</i>	20.75 (27.08)	192.00	2.68	1.34	0.19	14.28	2.37	10.68	7926
Vijetha	25.75 (30.48)	194.00	2.66	1.36	0.19	14.07	2.34	10.09	7428
Sanjeevini	28.25 (32.04)	197.00	2.61	1.29	0.18	13.95	2.21	9.36	7176
Resham Jyothi	31.50 (34.13)	195.00	2.53	1.32	0.18	13.23	2.24	8.97	6952
Control (Infected) <i>Témoin (infesté)</i>	45.50 (42.41)	202.00	2.26	1.13	0.15	13.27	1.76	6.10	5549
Control (un-infected) <i>Témoin (non infesté)</i>	00.00 (0.97)	180.00	2.71	1.40	0.21	14.28	2.66	14.18	10000
Mean / <i>Moyenne</i>	26.92 (30.12)	194.0	2.56	1.30	0.18	13.90	2.25	9.67	7336.30
SEm ±	0.192	1.215	0.016	0.032	0.011	0.187	0.018	0.017	1.87
C. D. at 5%	1.898	2.527	0.034	0.067	0.023	0.389	0.036	0.039	3.90

Data in parentheses are arc sin transformed values / *Les données entre parenthèses sont les valeurs arc sinus transformées.*

Nataraju (1995) noted that among the multi × bivoltine hybrids, PM × NB4D2 was comparatively less susceptible to *BmNPV* infection.

2. Probit response for larval dosage mortality to *BmNPV*:

All the cross breeds were found to be susceptible to *BmNPV* infection. However, the level of susceptibility differed among the evaluated cross breeds. The maximum *BmNPV* dosage required for 50 per cent larval mortality was 9.52×10^6 POB/ml in case of APM₁ × APS₈ followed by 2.17×10^6 POB/ml in PM × CSR₂ and 1.36×10^6 POB/ml in PM × NB4D₂ shows that these three breeds are comparatively less susceptible than all other cross breeds. The least LC₅₀ value of 1.42×10^4 POB/ml was registered in case of P₂D₁ × NB4D₂ indicates that this breed is comparatively more susceptible among the cross breeds tested (Table II). The results of the present study indicate comparatively higher tolerance of APM₁ × APS₈, PM × CSR₂ and PM × NB4D₂ breeds to *BmNPV* infection. Nataraju (1995) who reported that among the multi × bivoltines hybrids, PM × NB4D₂ was comparatively less susceptible to *BmNPV* infection, multi × bivoltines hybrid with PM as female parent viz., PM × NB4D₂, PM × KA and PM × NB₁₈ were found to be significantly less susceptible to *BmNPV* than the hybrids with MY₁ as female parent. Liushixian (1984) also reported the difference in susceptibility among the breeds to *BmNPV* infection from a study of 33 different silkworm breeds.

3. Bioefficacy of bed disinfectant against the *BmNPV*:

Among the evaluated bed disinfectants, TNAU formulation (2) recorded the minimum larval mortality of 20.75 per cent followed by 25.75 per cent in Vijetha and 28.25 per cent in Sanjeevini, whereas the maximum larval mortality of 36.75 per cent was registered in TNAU formulation (1) followed by 31.50 per cent in Resham Jyothi. The TNAU formulation (2) registered higher larval weight, fifth instar larval duration, cocoon weight, shell weight, shell ratio, silk productivity, cocoon yield by weight/10000 larvae and cocoon yield by number/10000 larvae (2.68g, 192.0h, 1.34g, 0.19g, 14.28 per cent, 2.37 cg, 10.68 kg and 7926 number respectively) followed by Vijetha (2.66g, 194.0 h, 1.36, 0.19g, 14.07 per cent, 2.34 cg, 10.09 kg and 7428 number respectively) (Table III).

The results showed that TNAU formulation (2) was highly effective against the *BmNPV* infection by reducing larval mortality besides enhancing the larval and cocoon parameters. The comparison with suitable controls indicates that use of effective bed disinfectant had a significant influence on the grasserie management. The obtained results are in accordance with Sivaprakasam and Rabindra (1996) who reported that application of Resham Keet Oushad after each moult and feeding of mulberry leaves treated with aqueous extract of *Psoralea corylifolia* @ 800ppm once during third, fourth and fifth instars of silkworm reduced the grasserie disease besides enhancing the larval and cocoon parameters. Manimegalai *et al.* (2000) reported that application of turmeric powder + chalk powder (1:5) @ 1 kg/100dfls resulted in reduction of grasserie by 62.16 and 62.45 per cent in summer and winter respectively. Parallel observations with botanicals were recorded by Samuel Manohar Raj (1994) and Manimegalai and Chandramohan (2006).

From the present investigation, it is concluded that APM₁ × APS₈, PM × NB4D₂ and PM × CSR₂ were found to be relatively tolerant to *BmNPV* infection among the eight silkworm cross breeds tested. The study also showed that TNAU formulation (2) was highly effective in reducing the larval mortality due to *BmNPV* infection. Moreover, the application of this bed disinfectant enhanced the economic parameters and cocoon yield. Hence, this could be utilized for managing the grasserie disease effectively.

REFERENCES

FINNEY D.J. (1971) Probit Analysis. Third Edition, Cambridge University Press, London, 333 p.

- KRISHNA N., CHANDRA A.L., SINHA S.S. (1992) Studies on the resistance of some mulberry silkworm races to nuclear polyhedrosis. Natl. Conf. Mulberry Seric. Res., Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, 127p.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYAN S.K., KUMARARAJ S. (1973) Sericultural manual 2, Silkworm Rearing, FAO Agricultural Services Bulletin, Rome, 131p.
- LIUSHIXIAN. (1984) Identification on the resistance of silkworm, *Bombyx mori* (L.) race to silkworm diseases. Sericologia, 24(1): 377-382.
- MANIMEGALAI S. (2003) Biodiversity of bacterial pathogens, *Bacillus* sp. of silkworm and their management. Ph.D. Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 163 p.
- MANIMEGALAI S., CHANDRAMOHAN N. (2006) Efficacy of botanicals against the grasserie disease of silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 46 (1) : 15-23.
- MANIMEGALAI S., SUBRAMANIAN A., CHANDRAMOHAN N. (2000) Efficacy of bed disinfectants and botanicals against grasserie disease of silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia 40(4): 585-590.
- NATARAJU B. (1995) Studies on diagnosis and prevention of nuclear polyhedrosis in silkworm, *Bombyx mori* L. Ph.D. Thesis. University of Mysore, Mysore, 96 p.
- PANSE V.G., SUKHATME P.V. (1957) Statistical Methods for Agricultural Workers, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 328 p.
- SAMUEL MANOHAR RAJ K. (1994) Effect of certain botanicals on the nuclear polyhedrosis virus disease of *Bombyx mori* Linnaeus. M.Sc. (Seri.) Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. 78p.
- SIVAPRAKASAM N. (1994) Seasonal incidence of nuclear polyhedrosis virus disease of silkworm, *Bombyx mori* L. and its management. Ph.D. Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 112 p.
- SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R.J. (1996) Integrated disease management methods for grasserie in silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 35(2): 122-127.
- SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R.J. (1997) Relative susceptibility of mulberry silkworm races (*Bombyx mori* L.) to nuclear polyhedrosis virus. Madras Agric. J., 84(3): 174-175.
- SUGUMORI H., NAGAMINET T. KOBAYASHI M. (1990) Analysis of structural polypeptides of *Bombyx mori* L. nuclear polyhedrosis virus. Appl. Entomol. Zool., 25(1): 67-77.
- UEDA K., OKOMOTO Y., SAKAI H., ARIMA K., YOSHARA H., SAKAGAMI Y. (1995) An antibiotic against silkworm jaundice virus grasserimycin, produced by *Streptomyces* species. J. Antibiotics Japan Seric. A., 8 : 91-95.
- VAIDHYA M.J. (1960) Indian Sericulture – Problems of Modernisation. Popular brochure, CSB Publication, Bombay. 64 p.
- VENKATA REDDY S., SINGH R.D., BAIG M., SENGUPTA K., GIRDHAR K., SINGHAL B.K. (1990) Efficiency of Asiphor as a bed disinfectant against incidence of diseases in silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J Seric., 29 : 147 – 148.
- VENKATESH C.M. (2000) Screening of new races to BmNPV and some bacteria. Annual Report. Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore, 88 p.
- WHITE LOCK V.H. (1977) Effect of larval maturation on mortality induced by nuclear polyhedrosis and granulosis virus infections of *Heliothis armigera*. J. Invertebr. Pathol., 30: 80-86.

SENSIBILITE RELATIVE DES CROISEMENTS DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. AU VIRUS DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE ET LUTTE CONTRE LE VIRUS A PARTIR DE SUBSTANCES BOTANIQUES

**H. V. RAMESH KUMAR, K. A. MURUGESH, C. A. MAHALINGAM,
N. CHANDRAMOHAN & P. MOHANRAJ**

Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore – 03, Inde.

Une étude a été réalisée pour connaître la sensibilité relative de croisements du ver à soie à BmNPV et pour évaluer des désinfectants de litière de la TNAU (Tamil Nadu Agricultural University) à base de substances botaniques pour lutter contre la grasserie. Tous les croisements s'avèrent significativement sensibles à l'infestation par BmNPV, alors que la dose de BmNPV augmente de 10^5 à 10^6 POB / ml. Cependant, le niveau de sensibilité diffère entre les hybrides testés. On enregistre la valeur CL_{50} maximum de $9,52 \times 10^6$ POB / ml chez $APM_1 \times APS_8$, suivie par $2,17 \times 10^6$ POB / ml chez $PM \times CSR_2$ et $1,36 \times 10^6$ POB / ml chez $PM \times NB_4D_2$, ce qui indique que ces lignées sont comparativement moins sensibles que tous les autres croisements. Parmi les désinfectants de litière évalués, la formulation (2) de la TNAU s'avère très efficace pour lutter contre la grasserie en diminuant la mortalité larvaire à 20,75 %, par comparaison à 45,50 % chez le témoin infesté. L'application de la formulation (2) de la TNAU augmente aussi significativement les caractères économiques du ver à soie ainsi que le rendement en cocons (10,68 kg / 10 000 larves) par rapport aux autres désinfectants de litière.

INTRODUCTION

L'éruption de maladies et les échecs des récoltes sont courants dans l'élevage du ver à soie dans les pays tropicaux. Le ver à soie mûrier, *Bombyx mori* L. est atteint par un certain nombre de maladies provoquées par des virus, des bactéries, des champignons et des protozoaires et parmi les maladies du ver à soie, la grasserie provoquée par le virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* (BmNPV) est l'une des maladies les plus graves dans les pays tropicaux et elle se produit toute l'année. La perte de rendement en cocons provoquée par la grasserie est comprise entre 22,5 % (Sivaprakasam, 1994) et 40 % (Vaidya, 1960). Plusieurs chercheurs ont étudié la sensibilité relative de races pures du ver à soie au BmNPV (LiushiXian, 1984 ; Khirishna et coll., 1992 ; Sivaprakasam et Rabindra, 1997), tandis que les rapports sur la sensibilité des hybrides de ver à soies sont très limités (Nataraju, 1995 ; Venkatesh, 2000). Bien que plusieurs pratiques de lutte différentes (Ueda et coll., 1955 ; Sivaprakasam et Rabindra, 1996 ; Venkata Reddy et coll., 1990) soient employées contre le BmNPV, la menace virale existe toujours. Nous avons donc entrepris cette étude pour explorer le niveau de sensibilité de différents croisements du ver à soie à BmNPV et pour évaluer la bioefficacité des désinfectants de litière formulés par la TNAU sur BmNPV.

MATERIELS ET METHODES

1. Sensibilité relative des croisements du ver à soie à BmNPV :

On isole BmNPV de vers à soie du 5ème âge infestés par la grasserie et on maintient la suspension mère purifiée au réfrigérateur. On compte le nombre de polyèdres en utilisant un hémocytomètre

Neubaer sous un microscope à contraste de phase. On prépare cinq doses de BmNPV pour l'expérience à partir de la suspension de la culture mère, c'est-à-dire 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 et 10^9 POB / ml par des dilutions successives. On obtient des pontes saines de deux croisements, PM $\times$ APS₈ et APM₁ $\times$ APS₈ auprès de l'*Andhra Pradesh State Sericulture Research and Development Institute* (APSSR&DI), à Hindupur et on obtient cinq croisements, PM $\times$ NB₄D₂, BL₂₃ $\times$ NB₄D₂, BL₂₄ $\times$ NB₄D₂, P₂D₁ $\times$ NB₄D₂ et MY₁ $\times$ NB₄D₂ auprès du *Central Sericultural Research and Training Institute* (CSR&TI), de Mysore dans le Karnataka. A côté de ces races, on prend aussi PM $\times$ CSR₂ comme témoin standard pour l'élevage. On adopte les techniques d'élevage du ver à soie d'après les descriptions de Krishnaswami et coll., (1973). On réalise l'expérience selon une conception aléatoire complète (CRD) avec trois répétitions pour chaque traitement. On donne la suspension de BmNPV aux larves par la méthode du disque de feuille (Sugumori et coll., 1990), en nourrissant les vers à soie avec des feuilles enduites de la suspension du virus peu après la deuxième mue. Ensuite, les lots traités avec le virus sont nourris avec des feuilles non contaminées. On nourrit les lots témoins avec des feuilles de mûrier normales. On recueille les données sur la mortalité larvaire et on les soumet à l'analyse probit d'après la méthode de Reed-Muench pour connaître la sensibilité relative (Finney, 1971).

2. Efficacité biologique des désinfectants de litière contre BmNPV :

On évalue deux désinfectants de litière à base de substances botaniques, c'est-à-dire les formulations (1) et (2) de la TNAU (Manimegalai, 2003) et trois désinfectants de litière à base de chaux disponibles dans le commerce, le Vijetha, le Resham Jyothi et le Sanjeevini pour lutter contre BmNPV. On prend le croisement du ver à soie, PM $\times$ CSR₂ pour l'évaluation biologique. On maintient quatre répétitions de 100 larves chacune selon une conception aléatoire complète. Avant le début du programme d'élevage, on vaporise les claies d'élevage pour l'expérience avec une suspension de BmNPV de 10^9 POB / ml en utilisant un vaporisateur manuel. On maintient deux témoins c'est-à-dire un témoin (infesté) et un témoin (non infesté). Après chaque mue et le 4^{ème} jour du 5^{ème} âge, on saupoudre les désinfectants de litière à raison de 4 kg / 100 pontes saines en utilisant une houppette à poussière (Sivaprakasam et Rabindra, 1996). On enregistre les données expérimentales sur les paramètres biologiques et de rendement et on les analyse selon la procédure statistique de Panse et Sukhatme (1957).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Effets de doses progressives de BmNPV sur la mortalité larvaire (%) :

Tous les croisements évalués s'avèrent significativement sensibles à l'infestation par BmNPV, alors que la dose de l'infestation par BmNPV augmente de 10^5 à 10^9 POB / ml. Parmi les croisements, on enregistre la mortalité larvaire maximum de 52,44 % chez P₂D₁ $\times$ NB₄D₂, suivi par 48,40 % chez BL₂₄ $\times$ NB₄D₂ et 47,11 % chez PM $\times$ APS₈, tandis qu'on enregistre la mortalité larvaire minimum de 41,77 % chez APM₁ $\times$ APS₈, suivi par 44,44 % chez PM $\times$ NB₄D₂ et 44,88 % chez PM $\times$ CSR₂ (Tableau I).

Les résultats indiquent que, parmi les croisements évalués, P₂D₁ $\times$ NB₄D₂, BL₂₄ $\times$ NB₄D₂ et PM $\times$ APS₈ s'avèrent des lignées très sensibles à l'infestation BmNPV, tandis que les lignées APM₁ $\times$ APS₈, PM $\times$ NB₄D₂ et PM $\times$ CSR₂ s'avèrent moins sensibles. Nos observations sont en accord avec les résultats précédents de White Lock (1977), qui a observé que la mortalité larvaire s'avère plus rapide lorsque le dosage de NPV augmente chez *Heliothis armigera*. Venkatesh (2000) a aussi rapporté que PM $\times$ NB₄D₂ est tolérant à BmNPV. Nataraju (1995) a constaté que parmi les hybrides poly $\times$ bivoltins, PM $\times$ NB₄D₂ est comparativement moins sensible à l'infestation par BmNPV.

2. Réponse Probit pour le dosage de *BmNPV* par rapport à la mortalité larvaire :

Tous les hybrides s'avèrent sensibles à l'infestation par *BmNPV*. Cependant, le niveau de sensibilité diffère entre les croisements évalués. La dose maximum de *BmNPV* nécessaire pour 50 % de mortalité larvaire est de $9,52 \times 10^6$ POB / ml chez $APM_1 \times APS_8$, suivie par $2,17 \times 10^6$ POB / ml chez $PM \times CSR_2$ et $1,36 \times 10^6$ POB / ml chez $PM \times NB_4D_2$, ce qui montre que ces trois lignées sont comparativement moins sensibles que tous les autres croisements. On enregistre la valeur CL_{50} la plus faible de $1,42 \times 10^4$ POB / ml dans le cas de $P_2D_1 \times NB_4D_2$, ce qui montre que cette lignée est comparativement plus sensible parmi les croisements testés (Tableau II). Les résultats de cette étude indiquent une tolérance comparativement plus élevée des lignées $APM_1 \times APS_8$, $PM \times CSR_2$ et $PM \times NB_4D_2$ à l'infestation par *BmNPV*. Nataraju (1995) a rapporté que parmi les hybrides poly $\times$ bivoltins, $PM \times NB_4D_2$ est comparativement moins sensible à l'infestation par *BmNPV*, les hybrides poly $\times$ bivoltin avec PM comme parent femelle, c'est-à-dire $PM \times NB_4D_2$, $PM \times KA$ et $PM \times NB_{18}$ s'avérant significativement moins sensibles à *BmNPV* que les hybrides avec MYI comme parent femelle. Liushixian (1984) a aussi rapporté une différence de sensibilité à l'infestation *BmNPV* entre les lignées à partir d'une étude réalisée chez 33 lignées différentes du ver à soie.

3. Bioefficacité des désinfectants de litière envers *BmNPV* :

Parmi les désinfectants de litière évalués, la formulation (2) de la TNAU enregistre le niveau minimum de mortalité de 20,75 %, suivie par 25,75 % avec le Vijetha et 28,25 % avec le Sanjeevini, tandis qu'on enregistre la mortalité larvaire maximum de 36,75 % avec la formulation (1) du TNAU, suivie par 31,50 % avec le Resham Jyothi. La formulation (2) de la TNAU enregistre le poids larvaire, la durée du cinquième âge larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, la productivité de la soie, le rendement en cocons en poids / 10 000 larves et le rendement en cocons en nombre / 10 000 larves les plus élevés (respectivement 2,68 g ; 192 h ; 1,34 g ; 0,19 g ; 14,28 % , 2,37 cg ; 10,68 kg et un nombre de 7926) suivie par le Vijetha (respectivement 2,66g, 194,0 h ; 1,36, 0,19 g, 14,07 % ; 2,34 cg ; 10,09 kg et un nombre de 7428) (Tableau III).

Les résultats montrent que la formulation (2) de la TNAU est très efficace contre l'infestation par *BmNPV* en diminuant la mortalité larvaire, tout en améliorant les paramètres de la larve et du cocon. La comparaison avec les témoins appropriés indique que l'utilisation de désinfectants de litière efficaces a une influence significative sur la lutte contre la grasserie. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Sivaprakasam et Rabindra (1996) qui ont rapporté que l'application de Resham Keet Ouhad après chaque mue et l'alimentation avec des feuilles de mûrier traitées avec un extrait aqueux de *Psoralea corylifolia* à raison de 800 ppm une fois pendant le troisième, le quatrième et le cinquième âge du ver à soie diminue la maladie de la grasserie, tout en améliorant les paramètres de la larve et du cocon. Manimegalai et coll., (2000) ont rapporté que l'application de poudre de curcuma + poudre de craie (1 : 5) à raison de 1 kg / 100 pontes saines entraîne la diminution de la grasserie de respectivement 62,16 et 62,45 % en été et en hiver. Des observations parallèles ont été enregistrées avec des substances botaniques par Samuel Manohar Raj (1994) et Manimegalai et Chandramohan (2006).

D'après notre étude, on peut conclure que parmi les huit hybrides de ver à soie testés, $APM_1 \times APS_8$, $PM \times NB_4D_2$ et $PM \times CSR_2$ s'avèrent relativement tolérants à l'infestation par *BmNPV*. L'étude montre aussi que la formulation (2) de la TNAU est très efficace pour diminuer la mortalité larvaire provoquée par l'infestation de *BmNPV*. De plus, l'application de ce désinfectant de litière augmente les paramètres économiques et le rendement en cocons. Elle peut donc être utilisée pour lutter efficacement contre la maladie de la grasserie.

SUSCEPTIBILITY STATUS OF THREE POPULAR COMMERCIAL HYBRIDS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. TO DIFFERENT SPECIES OF *ASPERGILLUS*

S. MANOCHAYA, M. BALAVENKATASUBBAIAH*, K. CHANDRASEKHARAN, J. JUSTIN KUMAR & S. D. SHARMA

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

Aspergillus species are known to infect silkworm during early instar larvae. The susceptibility status varies from breed to breed. In the present study three commercially exploited silkworm hybrids viz., CSR2 × CSR4 (Bivoltine hybrid), PM × CSR2 (Multi × bivoltine hybrid) and bivoltine double hybrid, (CSR6 × CSR26) × (CSR2 × CSR27) were tested for their susceptibility to *Aspergillus flavus*, *A. tamarii* and *A. niger*. The study revealed that *A. niger* was found non pathogenic to all three silkworm hybrids. *A. tamarii* was found more pathogenic to I and II instar larvae of all the tested hybrids than *A. flavus*. First instar larvae were more susceptible than the II instar larvae. The LC₅₀ value of *A. flavus* and *A. tamarii* for I and II instars of the commercially exploited hybrids covered under the present study are reported.

Keywords: *A. flavus*, *A. niger*, *A. tamarii*, LC₅₀ value, silkworm hybrids, susceptibility.

INTRODUCTION

Aspergillosis disease of silkworm is a mycosis caused by *Aspergillus* species of fungi. More than 10 species of *Aspergillus* are reported (Govindan and Devaiah, 1995) as pathogenic to silkworm. The early instars i.e., first and second instar silkworm larvae are more susceptible and later stage silkworms are fairly resistant to these diseases. Susceptibility of different breeds of silkworm to *Aspergillus* (Narayanaswamy and Govindan, 1989) and susceptibility among larval instars (Chinnaswamy and Devaiah, 1984; Kawakami and Mikuni, 1973) have been studied. The pathogen dose response relationships are important in the evaluation of both epizootiological and control studies (Feng *et al.*, 1985). Many studies were carried out in India and other sericultural countries on *Aspergillus* species and aspergillosis with respect to silkworm. But no studies are available on the pathogenicity of *Aspergillus* species in the newly evolved popular commercial hybrids of silkworm in India. In the present study pathogenicity of three different *Aspergillus* spp. viz., *A. flavus*, *A. tamarii* and *A. niger* was studied on three newly evolved popular commercial hybrids of silkworm.

MATERIALS AND METHODS

Three fungal pathogens viz. *A. flavus*, *A. tamarii* and *A. niger* were obtained from the Silkworm Pathology Laboratory of Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore and were sub-cultured in Petri plates using Czapeck Dox agar under laminar air flow chamber. After conidification, the conidia were observed under microscope for harvesting them to prepare the inoculum. The conidia were harvested from the Petri plates by using sterilized loop and suspended

* Author for correspondence

in sterilized distilled water and maintained as the stock inoculum. The conidial concentration in the stock solution was determined using Neubauer haemocytometer (Cantwell, 1974). The stock solution was serially diluted in sterilized distilled water to prepare the required conidial suspension *i.e.*, 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 and 1×10^3 for inoculation purpose.

Disease free layings of three popular commercial silkworm hybrids *viz.*, CSR2 $\times$ CSR4 (bivoltine hybrid), PM $\times$ CSR2 (multi $\times$ bivoltine hybrid) and bivoltine double hybrid (CSR6 $\times$ CSR26) $\times$ (CSR2 $\times$ CSR27) were received from Silkworm Seed Production Centre, Mysore and incubated at temperature and humidity conditions as described by Datta (1992) and hatched larvae were brushed separately. Separate batches of newly hatched (first instar) and second instar larvae were used for the present study. 100 larvae each were counted during each instar of the above three hybrids and then topically inoculated with 5 different conidial suspensions (1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 and 1×10^3 conidia/ml) of *A. flavus*, *A. tamarii* and *A. niger* by surface contamination. 400 μ l of conidial suspension was used to inoculate 100 larvae.

The experiment was conducted three times and three replications of each silkworm hybrid for *A. flavus*, *A. tamarii* and *A. niger* were maintained separately. One hundred worms were kept in each replication. The silkworms were reared on V1 variety of mulberry leaves under optimum temperature $28 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity 85-90% as advocated by Datta (1992). Dead larvae after inoculation of respective *Aspergillus* species were collected during first and second instars and mortality recorded for 8 days. The cumulative mortality was used to find out the LC₅₀ value by Probit analysis (Finney, 1971).

RESULTS

The results of the pathogenicity studies of the three species of *Aspergillus i.e.* *A. flavus*, *A. tamarii* and *A. niger* on three silkworm hybrids *i.e.*, CSR2 $\times$ CSR4, PM $\times$ CSR2 and bivoltine double hybrid indicated that *A. flavus* and *A. tamarii* were highly pathogenic while *A. niger* was non pathogenic to silkworm. This was true with all the tested hybrids during first and second instars. None of the inoculated conidial suspension of *A. niger* could cause mortality in the inoculated silkworm of the tested breeds (Table I).

Results after the inoculation of different concentrations of *A. flavus* and *A. tamarii* to first and second instar of all the tested hybrids are presented in Table II. In case of CSR2 $\times$ CSR4, the mortality due to *A. flavus* during the I instar ranged from 0.00 to 80.30% at different concentrations while that in II instar, ranged between 0.00 and 52.00%. The progressive mortality after the inoculation of different conidial concentrations of *A. flavus* to first instar CSR2 $\times$ CSR4 hybrid silkworm is depicted in Figure 1. Mortality started on the third day post inoculation (DPI) in batches inoculated with 1×10^7 , 1×10^6 and 1×10^5 conidia/ml but at 1×10^4 conidia/ml mortality started on the fourth day post inoculation. The three lower doses could not cause 50% mortality even after 8 DPI. At 1×10^6 conidia/ml mortality was maximum on the 7th DPI (64%) while at 1×10^7 conidia/ml maximum mortality was recorded on the 5th DPI (76%) itself. Progressive mortality due to *A. flavus* during the II instar of CSR2 $\times$ CSR4 as depicted in Figure 2 indicates that mortality started on the 3rd DPI at all the concentrations above 1×10^3 conidia/ml of inoculations. Except for 1×10^7 conidia/ml concentration inoculation of other doses could not cause mortality above 50%. Maximum mortality was observed 5th DPI in all the inoculum doses afterwards there was no significant increase in the mortality.

Mortality due to aspergillosis due to the inoculation of different concentrations of *A. tamarii* during the first and second instar silkworm of CSR2 $\times$ CSR4 hybrid ranged from 1.00 to 91.00% and 0.00 to 74.30% during I and II instars. Figure 3 depicts the progressive mortality after the inoculation of different concentrations of *A. tamarii* during the first instar. Mortality was initiated on 3 DPI at all the inoculated doses of the pathogen and there was no significant increase in the mortality after 5 DPI

at 1×10^4 (9%) and 1×10^5 (47%) conidia/ml inoculum concentration. Even though mortality started on 3rd DPI at all the inoculated doses of *A. tamarii* during second instar as indicated in Figure 4, only the highest dose (1×10^7 conidia/ml) could cause more than 50% mortality. Progressive mortality did not increase after 3rd DPI at 1×10^4 (11%), 4th DPI at 1×10^5 (30%) and 5th DPI at 1×10^6 (34%) doses.

In PM $\times$ CSR2 cross breed silkworm, the inoculation of *A. flavus* in different concentrations caused 1.00 to 34.60% mortality in first instar and 0.00 to 29.00% during second instar. The progressive mortality after the inoculation of *A. flavus* during the I instar of PM $\times$ CSR2 as depicted in Figure 5 indicates that none of the doses could cause 50% mortality even after 8 DPI. Initial mortality was observed on 3rd day at 1×10^6 and 1×10^7 conidia/ml and later in the case of other inoculated doses. Figure 6 indicates the progressive mortality due to *A. flavus* during the II instar of PM $\times$ CSR2. Mortality was negligible or nil below 1×10^6 dose. Even at higher doses (1×10^6 and 1×10^7 conidia/ml), mortality was only 27.60 and 29.00% respectively and mortality initiated on 3rd DPI at these doses.

Similarly, when *A. tamarii* was inoculated at different concentrations during I and II instars of PM $\times$ CSR2 cross breed, the mortality was between 1.00 and 80.60% and between 0.00 and 32.60% in the I and II instars. As indicated in Figure 7 mortality started on 3rd DPI above 1×10^5 doses while it started on 5 DPI at 1×10^4 dose. There was no increase in the progressive mortality at 1×10^5 doses after 5 DPI (40%). But during II instar mortality was below 50% in all the doses even after 8 DPI as indicated in Figure 8. The maximum mortality was 32% on 8 DPI at 1×10^7 dose.

Table I. Mortality due to *A. niger* at different conidial concentrations in first and second instars of different hybrids of silkworm.

Tableau I. Mortalité due à *A. niger* avec différentes concentrations de conidies pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge chez différents hybrides de ver à soie.

Instar	Dose	CSR2 $\times$ CSR4	PM $\times$ CSR2	Double hybrid
<i>Age</i>				<i>Hybride double</i>
I instar <i>1^{er} âge</i>	1×10^3	0.00	0.00	0.00
	1×10^4	0.00	0.00	0.00
	1×10^5	0.00	0.00	0.00
	1×10^6	0.00	0.00	0.00
	1×10^7	0.00	0.00	0.00
II instar <i>2^{ème} âge</i>	1×10^3	0.00	0.00	0.00
	1×10^4	0.00	0.00	0.00
	1×10^5	0.00	0.00	0.00
	1×10^6	0.00	0.00	0.00
	1×10^7	0.00	0.00	0.00

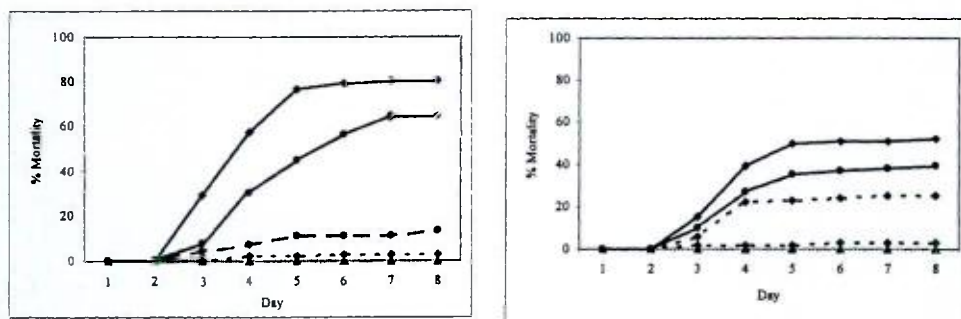


Figure 1. Progressive mortality at different doses of *A. flavus* in the I instar CSR2 x CSR4 silkworm.

Figure 1. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. flavus* pendant le 1er âge du ver à soie CSR2 x CSR4.

Figure 2. Progressive mortality at different doses of *A. flavus* in the II instar CSR2 x CSR4 silkworm.

Figure 2. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. flavus* pendant le 2^{ème} âge du ver à soie CSR2 x CSR4.

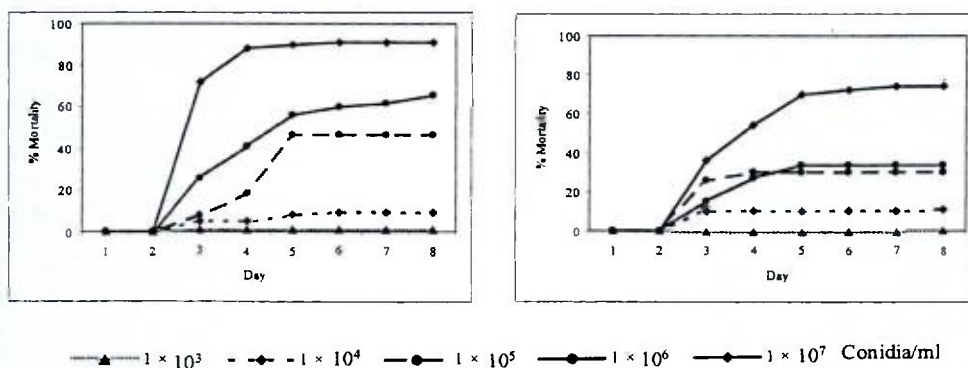


Figure 3. Progressive mortality at different doses of *A. tamarii* in the I instar CSR2 x CSR4 silkworm.

Figure 3. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. tamarii* pendant le 1er âge du ver à soie CSR2 x CSR4.

Figure 4. Progressive mortality at different doses of *A. tamarii* in the II instar CSR2 x CSR4 silkworm.

Figure 4. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. tamarii* pendant le 2^{ème} âge du ver à soie CSR2 x CSR4.

In bivoltine double hybrid also, due to *A. flavus* inoculation during I instar, the mortality ranged from 0.00 to 32.60% while in the II instar it ranged from 0.00 to 22.60%. Progressive mortality during I instar as depicted in Figure 9 indicates that mortality initiated on 3rd DPI at 1×10^7 inoculum dose while it started on 4th DPI at 1×10^6 inoculum dose. Mortality was below 50% in all the tested doses and it was negligible or nil below 1×10^6 inoculum dose. Figure 10 depicts the progressive mortality due to *A. flavus* during II instar which indicates no mortality below 1×10^6 inoculum dose. Initial mortality was on 3rd DPI at 1×10^7 dose and on 4th DPI at 1×10^6 dose.

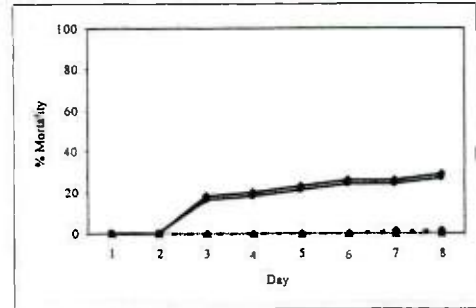
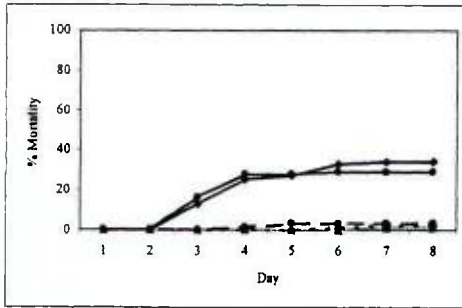
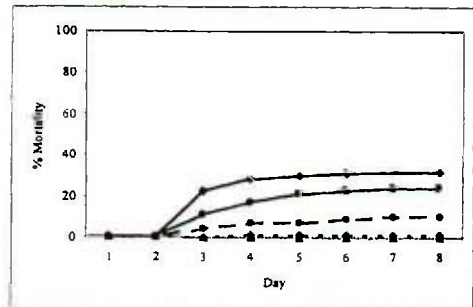
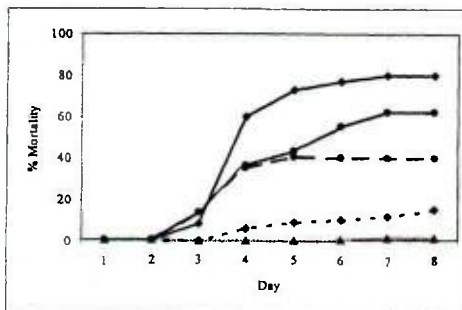


Figure 5. Progressive mortality at different doses of *A. flavus* in the I instar PM x CSR2 silkworm.

Figure 5. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. flavus* pendant le 1^{er} âge du ver à soie PM x CSR2.

Figure 6. Progressive mortality at different doses of *A. flavus* in the II instar PM x CSR2 silkworm.

Figure 6. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. flavus* pendant le 2^{ème} âge du ver à soie PM x CSR2.



—●— 1×10^3 —◆— 1×10^4 —●— 1×10^5 —●— 1×10^6 —●— 1×10^7 Conidia/ml

Figure 7. Progressive mortality at different doses of *A. tamaraii* in the I instar PM x CSR2 silkworm.

Figure 7. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. tamaraii* pendant le 1^{er} âge du ver à soie PM x CSR2.

Figure 8. Progressive mortality at different doses of *A. tamaraii* in the II instar PM x CSR2 silkworm.

Figure 8. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. tamaraii* pendant le 2^{ème} âge du ver à soie PM x CSR2.

Similarly, in case of *A. tamaraii* inoculation to the bivoltine double hybrid, the mortality ranged from 0.00 to 52.00% during I instar and 0.00 to 32.60% during the II instar. Mortality started on 3rd DPI at 1×10^6 and 1×10^7 inoculum doses as indicated in Figure 11. Mortality was negligible below 1×10^5 inoculum dose and only 1×10^7 dose could cause above 50% mortality. Progressive mortality details during the II instar of double hybrid after inoculating five doses of *A. tamaraii* are depicted in Figure 12. A maximum of 32% mortality only was caused even at the highest dose and below 1×10^6 inoculum dose the mortality was negligible.

Table II. Mortality due to *Aspergillus* species at different conidial concentrations in I and II instars of three popular commercial silkworm hybrids.

Tableau II. Mortalité due aux espèces d'Aspergillus avec différentes concentrations de conidies pendant le 1er et le 2ème âge chez trois hybrides de ver à soie commerciaux populaires.

Instar	Dose (Conidia/ml)	CSR2 × CSR4 % Mortality due to <i>Aspergillus</i> sp		PM × CSR2 % Mortality due to <i>Aspergillus</i> sp.		Double hybrid % Mortality due to <i>Aspergillus</i> sp.	
		<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>
Age	Dose (Conidies / ml)	CSR2 × CSR4 % de mortalité dû à <i>Aspergillus</i> sp.		PM × CSR2 % de mortalité dû à <i>Aspergillus</i> sp.		Hybride double % de mortalité dû à <i>Aspergillus</i> sp.	
		<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. tamarii</i>
1 st instar 1er âge	1×10^3	0.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	1×10^4	3.30	10.30	2.60	15.60	2.60	3.30
	1×10^5	13.60	49.30	3.30	40.00	3.30	2.30
	1×10^6	64.00	66.00	29.00	62.00	26.00	38.60
	1×10^7	80.30	91.00	34.60	80.60	32.60	52.00
2 nd instar 2ème âge	1×10^3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1×10^4	3.00	11.30	0.00	1.00	0.00	0.00
	1×10^5	25.60	30.60	1.00	10.30	0.00	4.30
	1×10^6	39.00	34.60	27.60	24.60	18.60	21.00
	1×10^7	52.00	74.30	29.00	32.60	22.60	32.60

The results of the Probit analysis on the mortality data after inoculating the five concentrations of *A. tamarii* and *A. flavus* to I and II instar of CSR2 × CSR4 hybrid silkworm are presented in Table III. The LC₅₀ value of *A. flavus* for the I instar of CSR2 × CSR4 was 3.7×10^5 conidia/ml while it was 2.2×10^6 conidia/ml for the II instar. The LC₅₀ value of *A. tamarii* for the I instar larvae was 2.6×10^5 conidia/ml while it was 5.8×10^5 conidia/ml for the II instar.

Table IV indicates the results of Probit analysis on the mortality data after inoculating the five progressive concentrations of *A. tamarii* and *A. flavus* to I and II instar of PM × CSR2 hybrid. LC₅₀ value of *A. flavus* was 4.8×10^7 conidia/ml for I instar while it was 1.8×10^8 conidia/ml for the II instar. For *A. tamarii*, LC₅₀ values were 4.2×10^5 and 2.4×10^7 conidia/ml for I and II instars, respectively.

Probit analysis results on the mortality data of double hybrid silkworm inoculated with the five different concentrations of *A. tamarii* and *A. flavus* in the I and II instar are presented in Table V. LC₅₀ value of *A. flavus* for I instar was 3.8×10^7 and 2.3×10^{12} conidia/ml for II instars, respectively. LC₅₀ values of *A. tamarii* were 3.0×10^6 and 8.1×10^8 conidia/ml for I and II instars, respectively.

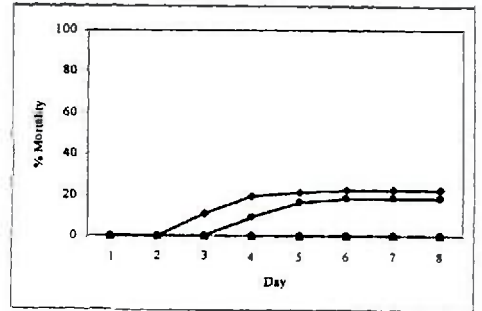
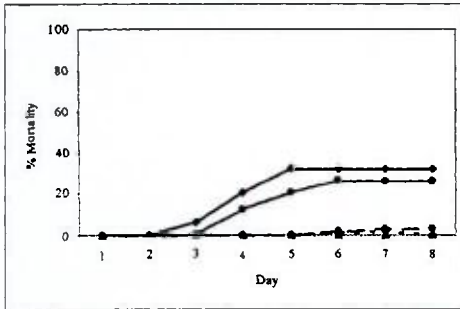
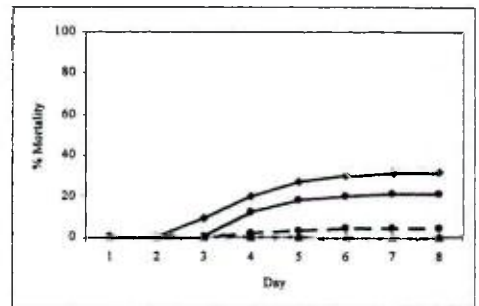
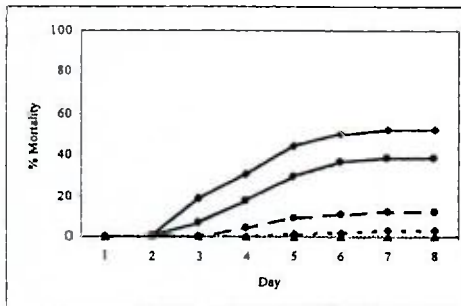


Figure 9. Progressive mortality at different doses of *A. flavus* in the I instar double hybrid silkworm.

Figure. 9. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. flavus* pendant le 1^{er} âge de l'hybride double du ver à soie.

Figure 10. Progressive mortality at different doses of *A. flavus* in the II instar double hybrid silkworm.

Figure. 10. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. flavus* pendant le 2^{ème} âge de l'hybride double du ver à soie.



—▲— 1×10^3 —◆— 1×10^4 —●— 1×10^5 —■— 1×10^6 —◆— 1×10^7 Conidia/ml

Figure 11. Progressive mortality at different doses of *A. tamarii* in the I instar double hybrid silkworm.

Figure. 11 Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. tamarii* pendant le 1^{er} âge de l'hybride double du ver à soie.

Figure 12. Progressive mortality at different doses of *A. tamarii* in the II instar Double hybrid silkworm.

Figure. 12. Mortalité progressive avec différentes doses d'*A. tamarii* pendant le 2^{ème} âge de l'hybride double du ver à soie.

Table III. Probit analysis of the mortality data of CSR2 × CSR4 silkworm hybrid at different inoculum doses of *Aspergillus* sps.

Tableau III. Analyse Probit des données de mortalité pour l'hybride du ver à soie CSR2 × CSR4 avec différentes doses d'inoculum d'*Aspergillus* sps.

<i>Aspergillus</i> sps.	Instar	X-mean	Y-mean	Probit equation	Chi - square	S.E. of b	Fiducial limit value	LC ₅₀
	Age	Moyenne X	Moyenne Y	Equation Probit	Chi carré	Ecart type de b	Limite fiducielle	Valeur CL ₅₀
<i>A. flavus</i>	I instar 1er âge	5.3740	4.8442	$Y = 0.62 + 0.79X$	7.36 ns	0.1164	2.5×10^5 to 5.6×10^5	3.7×10^5
	II instar 2ème âge	5.4560	4.5470	$Y = 1.74 + 0.51X$	4.03 ns	0.1005	1.1×10^6 to 4.4×10^6	2.2×10^6
<i>A. tamarii</i>	I instar 1er âge	5.3478	4.9414	$Y = 0.12 + 0.90X$	6.70 ns	0.1303	1.8×10^5 to 3.7×10^5	2.6×10^5
	II instar 2ème âge	5.2185	4.7411	$Y = 2.27 + 0.47X$	8.29 *	0.0915	3.1×10^5 to 1.1×10^6	5.8×10^5

Chi - square / Chi-carré.

ns Non significant / Non significatif.

* Significant at 5% level / Significatif au seuil de 5 %.

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

Table IV. Probit analysis of the mortality data of PM × CSR2 silkworm hybrid at different inoculum doses of *Aspergillus* sps.

Tableau IV. Analyse Probit des données sur la mortalité de l'hybride de ver à soie PM × CSR2 avec différentes doses d'inoculum d'*Aspergillus* sps.

<i>Aspergillus</i> sps.	Instar	X-mean	Y-mean	Probit equation	Chi – square	S.E. of b	Fiducial limit	LC ₅₀ value
	Age	Moyenne X	Moyenne Y	Equation Probit	Chi-carré	Ecart type de b	Limite fiducielle	Valeur CL ₅₀
<i>A. flavus</i>	I instar 1er âge	5.8992	4.0650	$Y = 0.96 + 0.53X$	6.96 ns	0.1403	1.3×10^7 to 1.7×10^8	4.8×10^7
	II instar 2ème âge	5.5946	4.0550	$Y = 2.06 + 0.36X$	8.03 *	0.1109	2.1×10^7 to 1.5×10^9	1.8×10^8
<i>A. tamarii</i>	I instar 1er âge	5.4002	4.8237	$Y = 0.64 + 0.77X$	5.31 ns	0.1179	2.8×10^5 to 6.4×10^5	4.2×10^5
	II instar 2ème âge	5.7622	4.1806	$Y = 1.25 + 0.51X$	7.41 ns	0.1227	7.8×10^6 to 7.1×10^7	2.4×10^7

Chi – square / Chi-carré.

ns : Non significant / Non significatif.

* Significant at 5% level / Significatif au seuil de 5 %.

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

Table V. Probit analysis of the mortality data of bivoltine double hybrid silkworm at different inoculum doses of *Aspergillus* sps.

Tableau V. Analyse Probit des données sur la mortalité de l'hybride de ver à soie bivoltin double avec différentes doses de l'inoculum d'*Aspergillus* sps.

<i>Aspergillus</i> sps.	Instar	X-mean	Y-mean	Probit equation	Chi – square	S.E. of b	Fiducial limit	LC ₅₀ value
	Age	Moyenne X	Moyenne Y	Equation Probit	Chi- carré	Ecart type de b	Limite fiducielle	Valeur CL ₅₀
<i>A. flavus</i>	I instar 1er âge	5.7562	4.1404	$Y = 1.44 + 0.47X$	7.81 ns	0.1232	1.1×10^7 to 1.4×10^8	3.8×10^7
	II instar 2ème âge	5.2295	4.0021	$Y = 3.27 + 0.14X$	14.18 **	0.0956	2.5×10^7 to 2.1×10^{17}	2.3×10^{12}
<i>A. tamarii</i>	I instar 1er âge	5.5650	4.4998	$Y = 1.45 + 0.55X$	6.62 ns	0.1079	1.5×10^6 to 6.0×10^6	3.0×10^6
	II instar 2ème âge	5.3587	4.0978	$Y = 2.74 + 0.25X$	3.83 ns	0.0978	2.8×10^7 to 2.3×10^{10}	8.1×10^8

Chi – square / Chi carré.

ns Non significant / Non significatif.

* Significant at 5% level / Significatif au seuil de 5 %.

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

DISCUSSION

In the present study on the pathogenicity of three *Aspergillus* species to three popular commercial silkworm hybrids, *A. flavus* and *A. tamarii* were found pathogenic while *A. niger* was non pathogenic. Earlier *A. niger* was reported as pathogenic to silkworm (Govindan and Devaiah, 1995) but in the present study it was proved to be non pathogenic. But Singh *et al.* (2004), reported that *A. flavus* and *A. tamarii* are pathogenic to silkworm while *A. niger* is non-pathogenic and the present results are in conformity with their findings. The variation in the results on the pathogenicity of *A. niger* with respect to the earlier researcher may be due to difference in strain used in the studies. Among the two pathogenic species tested *Aspergillus tamarii* was comparatively more pathogenic than *A. flavus* to all the tested hybrids.

Insects in general are observed to respond differentially to infection by microbial pathogens (Rinderer *et al.*, 1975, Briese, 1981). Such differences are genetically determined and have been studied extensively in silkworm to develop resistant breeds (Tanada and Kaya, 1993). In silkworms, a large difference exists among various strains in their susceptibility to infections of BmNPV, BmCPV, BmIFV, BmDNV, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus* sp. and *Nosema bombycis*. (Aratake, 1973 a, b; Aruga and Watanabe, 1964; Watanabe, 1966; Watanabe and Maeda, 1978, 1981; Chinnaswamy and Devaiah, 1984; Baig *et al.*, 1991). The difference in susceptibility among the most susceptible and highly tolerant/resistant races ranges from 875, 2,000, and 10,000 fold for BmNPV, BmCPV and BmDNV infections respectively (Xian, 1984).

The studies indicated difference in susceptibility in the tested hybrids against *A. flavus* and *A. tamarii*. During I instar the order of susceptibility of the tested hybrids to *A. flavus* was CSR2 × CSR4 > Double hybrid > PM × CSR2 and that to *A. tamarii* was CSR2 × CSR4 > PM × CSR2 > Double hybrid. During II instar the order of susceptibility of the tested hybrids to *A. flavus* was CSR2 × CSR4 > PM × CSR2 > Double hybrid and that to *A. tamarii* was CSR2 × CSR4 > PM × CSR2 > Double hybrid. The double hybrid, which is a combination of 4 breeds has got more hybrid vigour and it may be the reason for the comparatively less susceptibility to the tested fungal pathogens. Usually the multivoltine breeds were reported as less susceptible than the bivoltine breeds. Among the six multivoltine breeds tested during 1973, NS4 and Nistid were found less susceptible (Anon., 1973). Narasimhanna *et al.* (1976) screened some multivoltine breeds against *B. bassiana* and found that Moria followed by NS4 and Nistid were relatively tolerant. Reddy (1978) also found that the multivoltine breed, Pure Mysore offers more resistance while the bivoltine J122 is more susceptible. Studies by Raghavaiah and Jayaramaiah (1989) indicated NB18 as more susceptible than C. Nichi to *B. bassiana*. Jhansi Lakshmi *et al.* (2005) showed that a bivoltine race, APS8 as most susceptible compared to the other races when screened against *B. bassiana*. On the basis of a field survey, Chishti and Sohaf (1989) observed that NB4D2 × BH2 and KA × NB4D2 as the most susceptible breeds to muscardine in Kashmir.

There is a difference in susceptibility of different Japanese and Chinese silkworm breeds and hybrids to various pathogens viz., BmCPV, BmNPV and BmIFV (Watanabe, 1966, Aratake, 1973 a, b; Xian, 1984). This difference in response influences the initiation and development of the epizootics of infectious diseases in insects (Watanabe, 1987). The non-susceptibility of silkworm to BmDNV I infection is determined by a recessive gene (*nsd-1*) which is located on the 21st chromosome at 8.3 positions (Watanabe, 2002).

The silkworms are also known to gain tolerance with age. The early instars silkworms are comparatively more susceptible to infection by microbial pathogen and it decreases with larval aging from first to fourth instars (Aruga and Watanabe, 1964). The integument in insects forms a strong barrier for several microbes such as viruses, bacteria and protozoa. It is not only waterproof and physical barrier but also contains chemicals that inhibit the growth and penetration of microorganisms (David, 1967). The waxy epicuticular layer of silkworm integument contains free medium chain

saturated fatty acids, presumably caprylic acid, capric and linoleic acids that inhibit the invasion of the fungi. Higher amount of free medium chain fatty acids in the cuticle offers resistance against *Aspergillus* sp in silkworms (Koidsumi, 1957). Lipids in the epicuticle of silkworm, *B. mori* inhibit the invasion of *B. bassiana* and *Paecilomyces fumosa-roseus*. The integument and exuviae of resistant Chinese race silkworm had greater anti-fungal activity than those from susceptible Japanese strain (Koidsumi and Wada, 1955).

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author expresses her sincere thanks to the Director, CSRTI, Mysore and the Chairman, Department of Studies in Microbiology, Manasagangothri, University of Mysore, Mysore.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1973) Silkworm rearing techniques in the tropics. *Overseas Technical Co-Operation Agency*, Tokyo, pp. 180-199.
- ARATAKE Y. (1973 a) Strain difference of the silkworm, *Bombyx mori* L, in the resistance to a nuclear polyhedrosis virus. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 42: 230-238.
- ARATAKE Y. (1973 b) Difference in the resistance to infectious flacherie virus between the strains of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Sansi-Kenkyu*, 86: 48-57.
- ARUGA H. & WATANABE H. (1964) Resistance to *per os* infection with cytoplasmic polyhedrosis virus in the silkworm, *B. mori* L. *J. Insect Pathol.*, 6: 387-394.
- BAIG M. (1993). Studies on *Nosema bombycis* N. – A pathogen of *Bombyx mori* L. Ph.D. Thesis submitted to the University of Mysore, Mysore.
- BRIESE D. T. (1981) Resistance of insect species to microbial pathogens. In: *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*, Davidson (Ed.), Allanheld-Osmun, Totowa, New Jersey, USA. pp. 511-545.
- CANTWELL G. E. (1974) Insect diseases. Vol. II, Marcel Dekkar Inc. New York, pp. 501-547.
- CHINNASWAMY K. P. & DEVAIAH M. C. (1984). Susceptibility of different races of silkworm *Bombyx mori* L. to Aspergillosis caused by *Aspergillus tamarii* Kita., *Sericologia*, 24(4): 513-517.
- CHISHTI M. Z. & SOHAF K. A. (1989) Studies on the fungal disease of silkworm, *Bombyx mori* in Kashmir. *J. Ent. Res.*, 13(1): 72-75.
- DATTA R.K. 1992. Guidelines for Bivoltine Rearing. *Bulletin of Central Silk Board*, Bangalore.
- DAVID W. A. L. (1967) The physiology of insect integument in relation to the invasion of pathogens. In: *Insects and Physiology*. J. W. L. Beament and J. E. Treherne (Eds.) Oliver and Boyd. London. pp. 17-35.
- FENG Z, CARRUTHERS R.I., ROBSON D.S., & ROBERTS D.W. (1985) Age specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* 46, 259-264.
- FINNEY D. J. (1971) Probit analysis, Third edition, S. Chand and Co. New Delhi, p. 333.
- GOVINDAN R. & DEVAIAH M.C. (1995) Aspergillosis of silkworm. Silkworm pathology Technical Bull No-1 Dept. Seri, UAS, Bangalore, p. 68.
- JHANSILAKSHMI V.V.N.S., KAISER, J., VENKAIAH K., BHARATHI, D. & SATYA KUMAR, D.V.R. (2005) Differential susceptibility of silkworm, *Bombyx mori* L. races to white muscardine disease caused by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Entomon*, 30(1): 13-18.
- KAWAKAMI K & MIKUNI T. (1969) Studies on the causative fungi of *Aspergillus* disease of the silkworm larvae I. Pathogenicity to the silkworm larvae and tolerance to formalin of Aspergillosis isolates collected from co-operative rearing houses of young silkworm larvae. *Bull. Seric. Expt. Stn. (Tokyo)* 23: 327-370.

- KOIDSUMI, K. & WADA, Y. (1955) Studies on the antimicrobial function of insect lipids. IV. Racial differences in the antifungal activity in the silkworm integument. *Japan. J. Appl. Zool.*, 20: 184-190.
- KOIDSUMI, K. (1957) Antifungal action of cuticular lipids in insects. *J. Insect Physiol.*, 1: 40-51.
- NARAYANASWAMY T. K. & GOVINDAN R. (1989). Comparative susceptibility of some breeds of silkworm *Bombyx mori* L. to *Aspergillus flavus* Link. *Sericologia*, 29(1): 33-37.
- RAGHAVIAH G. & JAYARAMAIAH M. (1989) Lethal concentration of white muscardine fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to different races of mulberry silkworm. *Indian J. Seric.*, 28(1): 94-96.
- REDDY V. M. R. (1978) Studies on the white muscardine disease of silkworm, *Bombyx mori*, L. M.Sc. (Agri.) Thesis, University of Agriculture Sciences. Bangalore, p.93.
- RINDERER E. T., ROTHENBUHLER W. C. & KULINCEVIC J. M. (1975) Responses of three genetically different stocks of the honey bee to a virus from bees with hairless-black syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, 25(3): 297-300.
- SINGH G. P., SELVAKUMAR T, SHARMA, S. D., NATRAJU B. & DATTA R. K. (2004). Estimation of crop loss due to aspergillosis and pathogenicity of *Aspergillus* to Silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia* 44(3): 321-326.
- TANADA Y. & KAYA H. K. (1993) Insect pathology. Academic Press Inc., San Diego, California, p. 666.
- WATANABE H. & MAEDA S. (1978) Genetic resistance to *per oral* infection with a densovirus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 47: 209-214.
- WATANABE H. & MAEDA S. (1981) Genetically determined non susceptibility of the silkworm, *Bombyx mori* to infection with a densovirus (densovirus). *J. Invertebr. Pathol.*, 38(3): 370-373.
- WATANABE H. (1966) Genetic resistance to *per oral* infection with the cytoplasmic polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 35: 27-31.
- WATANABE H. (1987) The host population. In: *Epizootiology of insect disease*. Fuxa, J. R. and Tanada, Y. (Eds.), New York, John Wiley & Sons, pp. 71-112.
- WATANABE H. (2002) Genetic resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to viral diseases. *Current Science*, 83(4): 439-446.
- WEISER J. (1969) Immunity of insects to protozoa. In: *Immunity to parasitic animals*. G. J. Jackson, R. Herman and I. Singer (Eds.) Vol. 1. Appleton-Century-Crofts Educational Division, New York, USA. pp.129-147.
- XIAN L.S. (1984) Identification on the resistance of silkworm, *Bombyx mori* races to six types of silkworm diseases. *Sericologia*. 24: 377-382.

SENSIBILITE DE TROIS HYBRIDES COMMERCIAUX POPULAIRES DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L. A DIFFERENTES ESPECES D'*ASPERGILLUS*

S. MANOCHAYA, M. BALAVENKATASUBBAIAH*, K. CHANDRASEKHARAN, J. JUSTIN KUMAR & S. D. SHARMA

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

On sait que les espèces d'Aspergillus infestent les larves de ver à soie pendant les premiers âges. Le niveau de sensibilité varie d'une lignée à l'autre. Dans cette étude, on a testé la sensibilité de trois hybrides du ver à soie exploités commercialement, c'est-à-dire CSR2 × CSR4 (hybride bivoltin), PM × CSR2 (hybride poly × bivoltin) et l'hybride bivoltin double (CSR6 × CSR26) × (CSR2 × CSR27) à Aspergillus flavus, A. tamarai et A. niger. L'étude révèle qu'A. niger n'est pas pathogène envers les trois hybrides de ver à soie. A. tamarai s'avère plus pathogène envers les larves des 1^{er} et 2^{ème} âges qu'A. flavus chez tous les hybrides testés. Les larves du 1^{er} âge sont plus sensibles que les larves du 2^{ème} âge. Nous présentons la valeur CL50 pour A. flavus et A. tamarai pour les 1^{er} et 2^{ème} âges chez les hybrides commerciaux à l'étude.

INTRODUCTION

La maladie de l'aspergillose du ver à soie est une mycose provoquée par l'espèce de champignon *Aspergillus*. On a rapporté plus de 10 espèces d'*Aspergillus* pathogènes pour le ver à soie (Govindan et Devaiah, 1995). Les larves des premiers âges, c'est-à-dire le 1^{er} et le 2^{ème} âge sont plus sensibles et les vers à soie du dernier âge sont assez résistants à ces maladies. La sensibilité des différentes lignées du ver à soie à *Aspergillus* (Narayanasamy et Govindan, 1989) et la sensibilité des âges larvaires (Chinnaswamy et Devaiah, 1984 ; Kawakami et Mikuni, 1973) ont été étudiées. Les relations entre la réponse et la dose de pathogène sont importantes à la fois dans les études épizootiologiques et de lutte (Feng et coll., 1985). De nombreuses études ont été réalisées en Inde et dans d'autres pays séricicoles sur les espèces *Aspergillus* et sur l'aspergillose chez le ver à soie. Mais, il n'existe pas d'étude sur la pathogénicité de l'espèce *Aspergillus* chez les hybrides commerciaux populaires venant d'être mis au point en Inde. Dans cette étude, nous avons étudié la pathogénicité de trois espèces différentes d'*Aspergillus*, c'est-à-dire *A. flavus*, *A. tamarai* et *A. niger* chez trois hybrides commerciaux populaires du ver à soie venant d'être mis au point.

MATERIELS ET METHODES

On a obtenu trois pathogènes fongiques, c'est-à-dire *A. flavus*, *A. tamarai* et *A. niger* auprès du Laboratoire des Pathologies du ver à soie du Central Sericultural Research and Training Institute de Mysore et on les a mis en sous cultures dans des boîtes de Petri en utilisant de l'agar de Czapeck dans une cuve à flux d'air laminaire. Après la conidification, on observe les conidies sous un microscope pour les recueillir afin de préparer l'inoculum. On recueille les conidies dans les boîtes de Petri en utilisant une anse stérilisée et on les met en suspension dans de l'eau distillée stérilisée et

* Auteur auquel adresser la correspondance.

on les maintient en tant qu'inoculum souche. On détermine la concentration en conidies dans la solution mère en utilisant un hémocytomètre Neubauer (Cantwell, 1974). On procède à des dilutions successives de la solution mère dans de l'eau distillée stérilisée pour préparer les suspensions de conidies nécessaires, c'est-à-dire 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 et 1×10^3 dans le but de l'inoculation.

On reçoit des pontes saines de trois hybrides de ver à soie commerciaux populaires, c'est-à-dire CSR₂ × CSR₄ (hybride bivoltin), PM × CSR₂ (hybride poly × bivoltin) et l'hybride double bivoltin (CSR₆ × CSR₂₆) × (CSR₂ × CSR₂₇) du Centre de Production de Graines du Ver à Soie, de Mysore, on les incube dans les conditions de température et d'humidité décrites par Datta (1992) et on lève séparément les larves écloses. Pour cette étude, on utilise des lots séparés de larves venant d'éclore (premier âge) et de larves du 2^{ème} âge. On compte 100 larves pendant chaque âge chez les trois hybrides présentés plus haut et on les inocule de manière topique avec 5 différentes suspensions de conidies (1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 et 1×10^3 conidies / ml) d'*A. flavus*, d'*A. tamarii* et d'*A. niger* par contamination de la surface. On utilise 400 µl de suspension de conidies pour inoculer 100 larves.

L'expérience a été réalisée trois fois et on maintient trois répétitions de chaque hybride de ver à soie pour *A. flavus*, *A. tamarii* et *A. niger*. Cent vers sont conservés dans chaque répétition. On élève les vers à soie sur les feuilles de la variété de mûrier VI sous une température et une humidité relatives optimales de $28 \pm 1^\circ \text{C}$ et de 85 à 90 % d'après les recommandations de Datta (1992). On recueille les larves mortes après l'inoculation avec les espèces respectives d'*Aspergillus* pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge et on enregistre la mortalité pendant 8 jours. On utilise la mortalité cumulative pour trouver la valeur CL₅₀ par l'analyse Probit (Finney, 1971).

RESULTATS

Les résultats des études de pathogénicité de trois espèces d'*Aspergillus*, c'est-à-dire *A. flavus*, *A. tamarii* et *A. niger* chez trois hybrides de vers à soie, c'est-à-dire CSR₂ × CSR₄, PM × CSR₂ et l'hybride double bivoltin indiquent qu'*A. flavus* et *A. tamarii* sont très pathogènes, tandis qu'*A. niger* n'est pas pathogène pour le ver à soie. Cela est vrai avec tous les hybrides testés pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge. Aucune des suspensions de conidies d'*A. niger* inoculées n'entraîne de mortalité chez les vers à soie inoculés des lignées testées (Tableau I).

Les résultats après l'inoculation des différentes concentrations d'*A. flavus* et d'*A. tamarii* chez les premier et deuxième âge de tous les hybrides testés sont présentés dans le Tableau II. Dans le cas de CSR₂ × CSR₄, la mortalité due à *A. flavus* pendant le 1^{er} âge est comprise entre 0,00 à 80,30 % à différentes concentrations, tandis que pour le 2^{ème} âge, elle est comprise entre 0,00 et 52 %. La mortalité progressive après l'inoculation des différentes concentrations de conidies d'*A. flavus* pendant le 1^{er} âge chez l'hybride de ver à soie CSR₂ × CSR₄ est présentée dans la Figure 1. La mortalité commence le troisième jour après l'inoculation (DPI) chez les lots inoculés avec 1×10^7 , 1×10^6 et 1×10^5 conidies / ml mais à 1×10^4 conidies / ml, la mortalité commence le quatrième jour après l'inoculation. Les trois doses les plus faibles ne peuvent pas causer 50 % de mortalité même huit jours après l'inoculation. A 1×10^6 conidies / ml la mortalité est maximum le 7^{ème} jour après l'inoculation (64 %), tandis qu'à 1×10^7 conidies / ml on enregistre une mortalité maximum le 5^{ème} jour après l'inoculation. (76 %). La mortalité progressive due à *A. flavus* pendant le 2^{ème} âge de CSR₂ × CSR₄, (Figure 2) montre que la mortalité commence le 3^{ème} jour après l'inoculation à toutes les concentrations au-dessus de 1×10^3 conidies / ml. A l'exception de 1×10^7 conidies / ml, les autres doses inoculées n'entraînent pas plus de 50 % de mortalité. On observe la mortalité maximum le 5^{ème} jour après l'inoculation avec toutes les doses d'inoculum, ensuite il n'y a pas d'augmentation significative de la mortalité.

La mortalité due à l'aspergillose après l'inoculation de différentes concentrations d'*A. tamarii* pendant le premier et le deuxième âge chez l'hybride du ver à soie CSR₂ × CSR₄ est comprise entre 1 à 91 % et entre 0,00 à 74,30 % pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge. La figure 3 montre la mortalité progressive après l'inoculation de différentes concentrations d'*A. tamarii* pendant le 1^{er} âge. La mortalité commence le 3^{ème} jour après l'inoculation avec toutes les doses de pathogène inoculé et il n'y a pas d'augmentation significative de la mortalité après le 5^{ème} jour suivant l'inoculation avec une concentration d'inoculum de 1×10^4 (9 %) et de 1×10^5 (47 %) conidies / ml. Bien que la mortalité commence le 3^{ème} jour après l'inoculation avec toutes les doses d'inoculation d'*A. tamarii* pendant le 2^{ème} âge comme l'indique la Figure 4, seule la dose la plus élevée (1×10^7 conidies / ml) peut causer plus de 50 % de mortalité. La mortalité progressive n'augmente pas après le 3^{ème} jour suivant l'inoculation à 1×10^4 (11 %), après le 4^{ème} jour suivant l'inoculation à 1×10^5 (30 %) et après le 5^{ème} jour suivant l'inoculation à 1×10^6 (34 %), .

Chez l'hybride de ver à soie PM × CSR₂, l'inoculation d'*A. flavus* à différentes concentrations provoque une mortalité de 1 à 34,60 % pendant le 1^{er} âge et une mortalité de 0 à 29 % pendant le deuxième âge. La mortalité progressive après l'inoculation d'*A. flavus* pendant le 1^{er} âge chez PM × CSR₂, (figure 5) montre qu'aucune de ces doses n'a pu causer 50 % de mortalité même huit jours après l'inoculation. On observe la mortalité initiale le 3^{ème} jour à 1×10^6 et 1×10^7 conidies / ml et plus tard dans le cas des autres doses inoculées. La figure 6 montre la mortalité progressive provoquée par *A. flavus* pendant le 2^{ème} âge de PM × CSR₂. La mortalité est négligeable ou nulle en dessous d'une dose de 1×10^6 . Même à des doses plus élevées (1×10^6 et 1×10^7 conidies / ml), la mortalité n'est que de 27,60 et 29 % respectivement et la mortalité commence le 3^{ème} jour après l'inoculation avec ces doses.

De même, quand on inocule *A. tamarii* à différentes concentrations pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge chez l'hybride PM × CSR₂, la mortalité se situe entre 1 et 80,60 % et entre 0,00 et 32,60 % pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge. Comme l'indique la figure 7, la mortalité commence le 3^{ème} jour après l'inoculation à des doses au-dessus de 1×10^5 , tandis qu'elle commence le 5^{ème} jour après l'inoculation à une dose de 1×10^4 . Il n'y a pas d'augmentation de la mortalité progressive à des doses de 1×10^5 , après le 5^{ème} jour suivant l'inoculation (40%). Mais pendant le 2^{ème} âge, la mortalité se situe en dessous de 50 % à toutes les doses, même 8 jours après l'inoculation comme le montre la Figure 8. La mortalité maximum est de 32 % le 8^{ème} jour après l'inoculation à une dose de 1×10^7 .

Chez l'hybride bivoltin double aussi, avec l'inoculation d'*A. flavus* pendant le 1^{er} âge, la mortalité est comprise entre 0 à 32,60 %, tandis que pendant le 2^{ème} âge elle est comprise entre 0 à 22,60 %. La mortalité progressive pendant le 1^{er} âge (figure 9) indique que la mortalité commence le 3^{ème} jour après l'inoculation avec une dose d'inoculum de 1×10^7 , tandis qu'elle commence le 4^{ème} jour après l'inoculation à une dose d'inoculum de 1×10^6 . La mortalité est en dessous de 50 % avec toutes les doses testées et elle est négligeable ou nulle avec une dose d'inoculum en dessous de 1×10^6 . La figure 10 montre la mortalité progressive provoquée par *A. flavus* pendant le 2^{ème} âge et il n'y a aucune mortalité avec une dose d'inoculum en dessous de 1×10^6 . La mortalité initiale se produit le 3^{ème} jour après l'inoculation à une dose de 1×10^7 et le 4^{ème} jour après l'inoculation à une dose de 1×10^6 .

De même, dans le cas de l'inoculation d'*A. tamarii* chez l'hybride bivoltin double, la mortalité est comprise entre 0 à 52 % pendant le 1^{er} âge et entre 0,00 et 32,60 % pendant le 2^{ème} âge. La mortalité commence le 3^{ème} jour après l'inoculation avec des doses d'inoculum de 1×10^6 et de 1×10^7 , comme l'indique la figure 11. La mortalité est négligeable avec une dose d'inoculum en dessous de 1×10^5 et seule une dose de 1×10^7 peut entraîner plus de 50 % de mortalité. Les caractéristiques de la mortalité progressive pendant le 2^{ème} âge chez l'hybride double après avoir inoculé cinq doses d'*A. tamarii* sont présentées dans la figure 12. Un maximum de seulement 32 % de mortalité est provoqué même à la dose la plus élevée et avec une dose d'inoculum en dessous de 1×10^6 , la mortalité est négligeable.

Les résultats de l'analyse Probit sur les données de mortalité après l'inoculation de cinq concentrations d'*A. tamarii* et d'*A. flavus* pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge chez l'hybride de ver à soie CSR₂ × CSR₄ sont présentés dans le Tableau III. La valeur CL₅₀ pour *A. flavus* pendant le 1^{er} âge de CSR₂ × CSR₄ est de $3,7 \times 10^5$ conidies / ml, tandis qu'elle est de $2,2 \times 10^6$ conidies / ml pendant le 2^{ème} âge. La valeur CL₅₀ pour *A. tamarii* chez les larves du 1^{er} âge est de $2,6 \times 10^5$ conidies / ml, tandis qu'elle est de $5,8 \times 10^5$ conidies / ml pendant le 2^{ème} âge.

Le Tableau IV indique les résultats de l'analyse Probit pour les données de mortalité après l'inoculation de cinq concentrations progressives d'*A. tamarii* et d'*A. flavus* pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge chez l'hybride PM × CSR₂. La valeur CL₅₀ d'*A. flavus* est de $4,8 \times 10^7$ conidies / ml pendant le 1^{er} âge, tandis qu'elle est de $1,8 \times 10^8$ conidies / ml pendant le 2^{ème} âge. Pour *A. tamarii*, les valeurs CL₅₀ sont de $4,2 \times 10^5$ et $2,4 \times 10^7$ conidies / ml respectivement pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge.

Les résultats de l'analyse Probit pour les données de mortalité chez l'hybride double du ver à soie inoculé avec cinq concentrations différentes d'*A. tamarii* et d'*A. flavus* pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge sont présentés dans le Tableau V. La valeur CL₅₀ pour *A. flavus* est de respectivement $3,8 \times 10^7$ et $2,3 \times 10^{12}$ conidies / ml pour le 1^{er} âge et pour le 2^{ème} âge. Les valeurs CL₅₀ pour *A. tamarii* sont de $3,0 \times 10^6$ et $8,1 \times 10^8$ conidies / ml respectivement pour le 1^{er} et le 2^{ème} âge.

DISCUSSION

Dans cette étude sur la pathogénicité de trois espèces d'*Aspergillus* envers trois hybrides de vers à soie commerciaux populaires, *A. flavus* et *A. tamarii* s'avèrent pathogènes, tandis qu'*A. niger* n'est pas pathogène. Auparavant, on avait rapporté qu'*A. niger* était pathogène pour le ver à soie (Govindan et Devaiah, 1995), mais dans cette étude elle s'avère non pathogène. Singh et coll., (2004) ont rapporté qu'*A. flavus* et *A. tamarii* sont pathogènes pour le ver à soie mais qu'*A. niger* est non pathogène et nos résultats confirment leurs observations. La variation des résultats sur la pathogénicité d'*A. niger* au vu des recherches antérieures pourrait être due à l'utilisation de souches différentes dans les études. Parmi les deux espèces pathogènes testées, *Aspergillus tamarii* est comparativement plus pathogène qu'*A. flavus* pour tous les hybrides testés.

En général, on observe que les insectes répondent différemment aux infestations par des pathogènes microbiens (Rinderer et coll., 1975, Briese, 1981). Des différences de ce type sont déterminées génétiquement et elles ont été largement étudiées chez le ver à soie pour mettre au point des lignées résistantes (Tanada et Kaya, 1993). Chez le ver à soie, il existe une grande différence de sensibilité aux infestations BmNPV, BmCPV, BmIFV, BmDNV, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus* sp. et *Nosema bombycis* entre les différentes souches (Aratake, 1972 a, b ; Aruga et Watanabe, 1964 ; Watanabe 1966 ; Watanabe et Maeda, 1978, 1981 ; Chinnaswamy et Devaiah, 1984 ; Baig et coll., 1991). La différence de sensibilité entre les races les plus sensibles et très tolérantes / résistantes est de l'ordre de respectivement 875, 2000 et 10 000 fois pour les infestations BmNPV, BmCPV et BmDNV (Xian, 1984).

Les études indiquent une différence de sensibilité à *A. flavus* et à *A. tamarii* chez les hybrides testés. Pendant le premier âge, la sensibilité des hybrides à *A. flavus* se classe dans l'ordre CSR₂ × CSR₄ > l'hybride double > PM × CSR₂ et à *A. tamarii* dans l'ordre CSR₂ × CSR₄ > PM × CSR₂ > hybride double. Pendant le 2^{ème} âge, la sensibilité des hybrides testés à *A. flavus* se classe dans l'ordre CSR₂ × CSR₄ > PM × CSR₂ > hybride double et celle à *A. tamarii* dans l'ordre CSR₂ × CSR₄ > PM × CSR₂ > hybride double. L'hybride double, qui est une combinaison de 4 lignées à plus de vigueur hybride et cela pourrait expliquer sa sensibilité comparativement moins importante aux pathogènes testés. En général, on rapporte que les lignées polyvoltines sont moins sensibles que les lignées bivoltines. Parmi, les six lignées polyvoltines testées en 1973, NS4 et Nistid se sont avérées moins sensibles (Ano., 1973). Narasimhanna et coll., (1976) ont évalué des lignées polyvoltines par rapport à *B. bassiana* et constaté que Moria, suivie par NS4 et Nista sont relativement tolérantes.

Reddy (1978) a aussi constaté que la lignée polyvoltine Pure Mysore offre plus de résistance, tandis que la lignée bivoltine J122 est plus sensible. Les études par Raghavaiah et Jayaramaiah (1989) ont montré que NB18 est plus sensible que *C. nichii* à *B. bassiana*. Jhansi Lakshmi et coll., (2005) ont montré qu'une race bivoltine, APS8 est très sensible à *B. bassiana* par comparaison aux autres races évaluées. Lors d'une étude sur le terrain, Chishti et Sohaf (1989) ont observé que NB4D2 × BH2 et KA × NB4D2 sont les lignées les plus sensibles à la muscardine au Cachemire.

Les différentes lignées et hybrides du ver à soie japonais et chinois présentent une différence de sensibilité à différents pathogènes, c'est-à-dire à BmCPV, BmNPV et BmIFV (Watanabe, 1966, Aratake, 1973 a, b ; Xian, 1984). Cette différence de réponse influence le commencement et le développement des épizooties de maladies infectieuses chez les insectes (Watanabe, 1987). L'insensibilité du ver à soie à l'infestation BmDNV1 est déterminée par un gène récessif (*nsd-1*) qui est situé sur le 21^{ème} chromosome aux positions 8,3 (Watanabe, 2002).

Les vers à soie sont aussi connus pour gagner de la tolérance avec l'âge. Les premiers âges des vers à soie sont comparativement plus sensibles à l'infestation par les pathogènes microbiens et la sensibilité diminue avec le vieillissement des larves du premier au quatrième âge (Aruga et Watanabe, 1964). Le tégument chez les insectes forme une barrière puissante à plusieurs microbes, tels que les virus, les bactéries et les protozoaires. Il est non seulement étanche et représente une barrière physique, mais il contient aussi des substances chimiques qui inhibent la croissance et la pénétration des micro-organismes (David, 1967). La couche épicuticulaire cireuse du tégument du ver à soie contient des acides gras libres saturés à chaîne moyenne, probablement de l'acide caprylique et des acides linoléiques, qui inhibent l'invasion par les champignons. Une quantité plus élevée d'acides gras libres à chaîne moyenne dans la cuticule offre une résistance à l'espèce *Aspergillus* chez les vers à soie (Koidsumi, 1957). Les lipides dans l'épicuticule du ver à soie, *B. mori*, inhibent l'invasion par *B. bassiana* et par *Paecilomyces fumosa-roseus*. Le tégument et l'exuvie des races de ver à soie chinoises ont une activité anti-fongique plus importante que ceux des souches japonaises sensibles (Koidsumi et Wada, 1955).

DEVELOPMENT OF NEW COLD STORAGE PRESERVATION TECHNOLOGY FOR CROSS BREED (PM × CSR2) EGGS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

K. L. RAJANNA¹, G. VEMANDA REDDY¹, V. K. HARLAPUR² &
H. K. BASAVARAJA¹

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

2. Silkworm Seed Production Centre, Malavally-571430, India

The cross breed eggs (PM × CSR2) obtained by 3h coupling, two oviposition periods (24h & 48h) with 3 embryonic age groups (24h, 36h & 44h) were subjected for preservation at 5 °C in single step refrigeration and at 5 °C and 2.5 °C under double step preservation from 30 to 60 days. During double step preservation, the eggs were passed through an intermediate care for 2 days at 15 °C at the time of shifting from 5 °C to 2.5 °C. These eggs were released from cold storage, incubated at standard conditions followed by black boxing and exposed to light for 2 hours to obtain effective hatching. Embryonic stage-17 was identified during first step and stage-18 during second step preservation. The results indicated that the hatchability, early stage loss, cocoon yield and cocoon characters were not significantly affected in 50 days preserved batches under double step refrigeration compared to control. After successful laboratory studies, it was demonstrated at field level to verify its validity. Field trials conducted at Chintamani and Malavally area of Karnataka state with 7426 Dfls are encouraging and the results are on par with laboratory findings. Hence, this technology is recommended to the commercial cross breed egg producers to meet the requirement of silkworm eggs during demand period and also to avoid wastage of eggs (unsold) during slack season.

Keywords: Cross breed eggs, preservation, hatchability, crop yield.

INTRODUCTION

Mulberry sericulture is confined to temperate, tropical and sub-tropical conditions. Both bivoltine and multivoltine × bivoltine hybrids are exploited for raw silk production. Bivoltine races lay diapause eggs which are productive and their eggs can be preserved safely from 20-300 days to postpone hatching by adopting suitable preservation schedules. Different schedules of preservation for hibernated silkworm eggs and methods of preservation of eggs for short and long term without causing any physiological injury to the eggs have been investigated. (Vemananda Reddy *et al.*, 2004). The safe period of cold storage of silkworm eggs is dependent up on the stage of embryo (Yamashita and Yaginuma T, 1991). Embryogenesis in silkworm needs the best eco-physiological conditions to retain the vigor of newly hatched larvae (Yamashita and Hasegawa, 1985). Further, the conversion of glycogen into polyols (sorbitol and glycerol) completed during aestivation period and reconversion of polyols into glycogen at the time of termination of diapause, which is utilized, for embryonic development is extensively studied (Yaginuma and Yamashita, 1977; Yamashita and Yaginuma, 1991).

Tropical sericulture is multivoltine oriented, practiced throughout the year and silkworm eggs are required in all the seasons. Since the eggs are non diapause in nature, they cannot be preserved

for longer duration and there is a limitation of preservation to the maximum of 20 days. Even though, non-diapause eggs are less tolerant to cold, many times it is inevitable to postpone hatching beyond 20 days due to slackness, seasonal changes and non availability of leaf. Several workers have attempted refrigeration of non-diapause eggs to postpone hatching (Higashi, 1971; Datta *et al.*, 1972; Tayade *et al.*, 1987; Manjula *et al.*, 1993; Hurakadli *et al.*, 1998; Kumareshan *et al.*, 2004; Rajanna *et al.*, 2008; 2009). Unlike in bivoltines, the conversion of glycogen to glycerol and sorbitol initiates only at low temperature in non-diapause eggs (Furusawa *et al.*, 1987) indicating a short time adaptation to cold stress. Hence, an attempt has been made to evolve a suitable long-term preservation technique by exploiting both embryonic stage and double step refrigeration.

MATERIALS AND METHODS

Moths of Pure Mysore and CSR2 emerged from quality seed cocoons were given coupling for 3h (PM × CSR2). After decoupling, the females were allowed for oviposition at standard conditions of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ temperature and $75 \pm 5\%$ RH for 24h and 48h. This study of cross breed egg preservation was taken up with the following three treatments.

Treatments:

- T1- 3h coupling, 24h oviposition and 24h embryonic age
- T2- 3h coupling, 24h oviposition and 36h embryonic age
- T3- 3h coupling, 48h oviposition and 44h embryonic age
- Control- 3h coupling, 48 h oviposition and 50h embryonic age (20 days preserved)

The zero hour was fixed after 8h from decoupling time wherein 85-90% eggs are laid. Based on the zero hour, the embryonic age of the eggs was calculated and the eggs of 24, 36 and 44h aged were preserved at 5°C .

The eggs were preserved at 5°C continuously from 30 to 60 days, and released at an interval of 10 days in all the three treatments to study the effect of refrigeration on hatchability. In another set of study, the eggs were preserved for 20 days of initial cold storage at 5°C followed by an intermediate temperature of 15°C for two days. Later, the eggs were shifted to 2.5°C for 10, 20, 30 and 40 days (double step refrigeration) respectively, for a total period of 60 days. Both at the time of preservation and release, the eggs were compulsorily passed through 15°C for 3h to avoid cold injury and thermal shock (Fig. 1). The released eggs were incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH followed by black boxing and the eggs were exposed to light (about 450 lux) for 2 hours to obtain uniform hatching. The effect of refrigeration on hatchability under different schedules has been recorded. This experiment was repeated three times with three replications of 20 dfls each in each treatment. Bioassay studies were conducted under laboratory conditions to study the effect of long term preservation of cross breed eggs on important rearing parameters such as early stage loss (ESL), effective rate of rearing (ERR), cocoon weight (SCW), shell weight (SSW), and shell percentage (SP). After successful laboratory studies, large scale field trials were conducted using 7426 layings in Chintamani and Malavally area, the prominent commercial rearing areas of Karnataka state.

Embryo isolation technique:

To identify the stages during single and double step refrigeration, the embryos were isolated from the eggs by adopting Potassium hydroxide method. Egg cards were dipped in boiling 2-4% potassium hydroxide (KOH) solution (2-4g/100ml water) in a beaker for 20-30 seconds and then washed in 60°C water. The contents was transferred to water maintained at room temperature. Then water was squirted using Pasteur pipette (dropper) over eggs to release embryos. Care should be taken to see that KOH does not dissolve embryos.

Field trials:

To evaluate the long term preservation technology of cross breed eggs at field level, four trials were conducted along with 20 days preserved eggs as a control for comparison. Farmers were randomly selected from 13 villages in Chintamani and 9 villages in Malavally area. A total quantity of 3446 Dfls preserved for 50 days and 3980 Dfls (Control) have been tested with 18 and 17 farmers, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

The data pertaining to hatchability of eggs preserved under single and double step refrigeration are presented in Table I. The effect of treatment, season and interaction of treatment and season was significant during 30-60 days of preservation. There was significant difference in hatchability between single and double step refrigeration with an exception to 40 days preservation under 3h/24h/36h treatment which corroborates the findings of earlier studies (Anonymous, 1995). The hatching was significantly higher under double step refrigeration treatments which ranged from 93 to 93.79% with an increase of 17.37% over single step 50 days preservation. The high hatchability in double step refrigeration might be mainly due to the retention of polyols for longer duration at 2.5°C than at 5°C, which protects embryos from cold stress (Furusawa, *et al.*, 1987, and 1992). These observations corroborates the earlier findings of Hurkadli *et al.* (1998), that the cross breed (PM × NB4D2) eggs of the age group between 24-30h, 36-42h and 48-50h after oviposition can safely be cold stored for a total period of 75, 65 and 54 days, respectively by adopting two step refrigeration.

The earlier authors studied with PM × NB4D2 which was not a high productive hybrid compared to PM × CSR2. This study lacks the support of the embryonic evidence, early stage loss and moreover they restricted their investigations to laboratory.

In the present study, cold stored performance of cross breed eggs was supported by the embryonic studies. The embryonic age at the time of egg preservation at 5°C is found to be stage-17 (Early appendages formation stage) and it reaches stage 18 (Advanced appendages formation stage) when the eggs are shifted to 15°C for 2 days and this is the appropriate stage for shifting the eggs to 2.5°C and preserved them up to 30 days at 2.5°C (Fig. 2). If the embryo reaches stage- 19 (shortening of embryo), the eggs are not suitable for double step refrigeration.

The bioassay studies which were conducted for five treatments consisting of different oviposition period, embryonic age and varied duration of preservation of eggs along with control are presented in Table II. The effect of treatment and interaction between treatment and season was significant for all the rearing parameters. However, the effect of season was found to be significant with hatchability, larval weight, cocoon weight and shell weight. The early stage loss ranged from 7.69-33.12% and significantly lowers in double step refrigeration. The data envisages that by adopting double step preservation, 23.6% of early stage loss can be avoided when compared to the loss recorded with single step refrigeration i.e., 3h/48h/44h(50). The hatchability, ERR by No., ERR by Wt., cocoon weight and shell weight were found to be significantly higher with the double step refrigeration treatments i.e., 3h/24h/24h (20+30), 3h/24h/36h (20+30) and 3h/48h/44h (20+30). However, the shell percentage in 3h/48h/44h treatment was not significantly different from control and it was significantly lower in the remaining treatments. The comparative performance of bioassay studies revealed that important rearing parameters such as larval weight (33.52~33.60g) ERR by No. (8635~8640), ERR by Wt. (12.893~12.900 kg), cocoon weight (1.658~1.662g), shell weight (0.321~0.323g) and shell percentage (19.36~19.43%) of 3h/48h/44h (20+30) treatment was not significantly different from control (20 days) indicating the advantage of double step preservation to maintain vitality of eggs up to 50 days.

Table I. Hatching of PM × CSR2 eggs preserved under single and double step refrigeration.

Tableau I. Eclosion des oeufs de PM × CSR2 conservés avec une réfrigération en une ou deux étapes.

Duration (days)	30		40		50		60		Control (20 days)
Treatment	Single	Double (20+10)	Single	Double (20+20)	Single	Double (20+30)	Single	Double (20+40)	
Durée (jours)	30		40		50		60		Témoin (20 jours)
Traitement	Une étape	Deux étapes (20+10)	Une étape	Deux étapes (20+20)	Une étape	Deux étapes (20+30)	Une étape	Deux étapes (20+40)	
3h/24h/24h	91.70 ± 2.33	93.82 ± 0.93	88.95 ± 0.93	93.25 ± 0.93	87.68 ± 1.13	93.10 ± 0.96	83.25 ± 1.77	91.80 ± 1.73	92.67 ± 1.59
3h/24h/36h	94.96 ± 1.67	95.03 ± 0.49	96.22 ± 1.53	95.80 ± 1.74	84.89 ± 1.21	93.79 ± 0.61	83.24 ± 1.49	93.20 ± 0.79	97.26 ± 1.50
3h/48h/ 44h	92.45 ± 1.35	94.88 ± 1.11	86.27 ± 1.72	93.18 ± 0.63	75.63 ± 1.22	93.00 ± 1.29	66.85 ± 1.22	91.35 ± 1.51	94.36 ± 0.51
CD@5% for / DC à 5 % pour Treat. / Traitement	0.45		0.55		0.36		0.44		0.95
Season / Saison	0.32		0.39		0.26		0.31		NS
T × S	0.78		0.96		0.63		0.77		1.64

Table II. Rearing performance of PM × CSR2 eggs preserved for 50 days under different schedule.

Tableau II. Performance d'élevage des œufs de PM × CSR2 conservés pendant 50 jours selon différents calendriers.

Treatment	Hatching (%)	ESL (%)	Larval weight (g)	ERR by no	ERR by weight (kg)	Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	SP (%)
Traitement	Eclosion (%)	ESL (%)	Poids larvaire (g)	ERR en nombre	ERR au poids (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)
3/24/24 (20+30) (double step) (deux étapes)	94.48 ±1.06	7.69 ±0.61	32.31 ±0.47	8125 ±170	11.918 ±0.241	1.633 ±0.045	0.293 ±0.016	17.94 ±0.67
3/24/36 (50) (single step) / (une étape)	90.03 ±1.51	22.34 ±1.19	32.65 ±0.52	6390 ±164	9.150 ±0.150	1.563 ±0.040	0.283 ±0.011	18.10 ±0.61
3/24/36 (20+30) (double step / deux étapes)	93.20 ±0.86	11.06 ±0.42	32.34 ±0.91	8275 ±169	11.725 ±0.261	1.633 ±0.039	0.303 ±0.013	18.55 ±0.52
3/48/44 (50) (single step) (une étape)	79.35 ±1.63	33.12 ±0.61	29.83 ±0.86	4512 ±150	6.225 ±0.248	1.468 ±0.066	0.265 ±0.008	18.08 ±0.92
3/48/44 (20+30) (double step / deux étapes)	95.00 ±1.50	9.52 ±0.49	33.52 ±0.62	8635 ±127	12.893 ±0.176	1.658 ±0.040	0.321 ±0.012	19.36 ±0.45
3/48/44 (20) (Control) / Témoin	95.50 ±0.25	9.45 ±0.16	33.60 ±0.28	8640 ±66	12.900 ±0.105	1.662 ±0.017	0.323 ±0.004	19.43 ±0.20
CD@5% for / DC à 5 % pour Treat (T) / Traitement (T)	0.470	0.306	0.380	92	0.143	0.020	0.07	0.502
Season (S) / Saison (S)	0.332	NS	0.269	NS	NS	0.015	0.005	NS
T × S	0.814	0.530	0.658	159	0.248	0.036	0.012	0.870

ERR: Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage.

Table III. Field performance of PM × CSR2 eggs preserved for 50 days.

Tableau III. Performance sur le terrain des oeufs de PM × CSR2 conservés pendant 50 jours.

Preservation period	Trial no.	No. of farmers	No. of Dfls	Fecundity (No.)	Hatching (%)	Yield / 100 dfls (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell %
<i>Durée de conservation</i>	<i>No. du test</i>	<i>Nbre de fermiers</i>	<i>Nbre de pontes saines</i>	<i>Fécondité (Nbre)</i>	<i>Eclosion (%)</i>	<i>Rendement / 100 pontes saines (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>% de richesse soyeuse</i>
Eggs preserved for 50 days	1	3	641	465 ± 20	94.97 ± 0.53	76.91 ± 7.27	2.009 ± 0.107	0.328 ± 0.008	16.36 ± 0.66
<i>Oeufs conservés pendant 50 jours</i>	2	2	995	500 ± 55	97.66 ± 1.03	73.87 ± 1.18	1.882 ± 0.281	0.311 ± 0.038	16.56 ± 0.45
	3	4	995	484 ± 37	92.96 ± 5.28	64.42 ± 11.53	1.719 ± 0.119	0.275 ± 0.021	15.98 ± 0.10
	4	9	815	460 ± 13	95.56 ± 1.12	61.28 ± 7.19	1.689 ± 0.11	0.314 ± 0.04	18.58 ± 1.72
Total / Average		18	3446	471	95.06	66.22	1.770	0.308	17.41
<i>Total / Moyenne</i>									
Eggs preserved for 20 days (control)	1	3	995	483 ± 26	95.02 ± 1.93	77.96 ± 6.39	2.005 ± 0.066	0.351 ± 0.014	17.50 ± 0.30
<i>Oeufs conservés pendant 20 jours (témoin)</i>	2	3	995	469 ± 6	98.04 ± 0.95	74.87 ± 7.72	1.903 ± 0.110	0.352 ± 0.027	18.50 ± 0.33
	3	3	995	495 ± 35	96.18 ± 1.10	73.17 ± 4.99	1.676 ± 0.101	0.288 ± 0.025	17.18 ± 0.85
	4	8	995	467 ± 8	94.47 ± 1.00	62.00 ± 8.80	1.625 ± 0.10	0.292 ± 0.01	17.99 ± 0.59
Total / Average		17	3980	475	95.51	68.46	1.750	0.312	17.85
<i>Total / moyenne</i>									

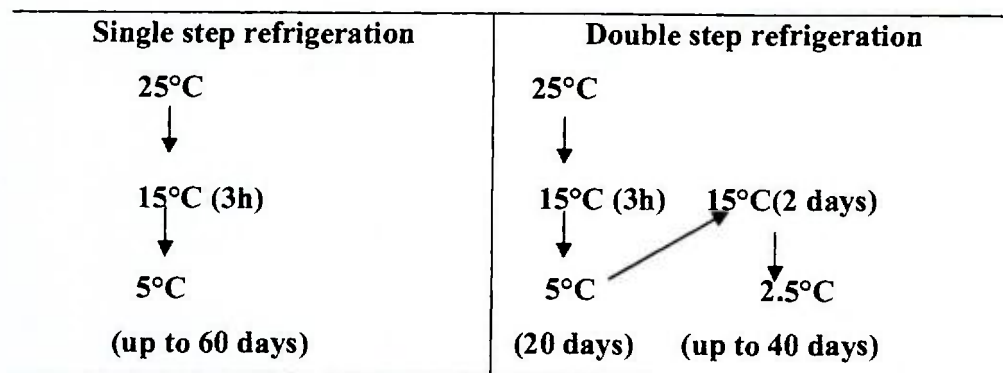


Fig. 1. Schedule of preservation.

*Fig. 1. Calendrier de conservation.*stage at 20 days
preservation

Stage- 17

stage at 50 days
preservation

Stage- 18

Fig. 2. Embryonic stages
during 20 and 50 days
preservation.*Fig. 2. Stades embryonnaires
pendant 20 et 50 jours de
conservation.***Field validation of technology:**

For the purpose of field validation, four trials were conducted in 22 villages with 35 farmers (Table III). The group of farmers comprising big, medium and small and the rearing performance was found to be similar with all the farmers. Data demonstrate that there was no considerable difference in hatching and cocoon yield between control (20days) and eggs preserved for longer duration (50 days).

The new technology developed for cross breed eggs is depicted in Fig. 3 with an example. Moths of Pure Mysore and CSR2 emerged were coupled for 3h. Moths were decoupled and the females were allowed for oviposition at optimum temperature and humidity with total darkness for 48h. After

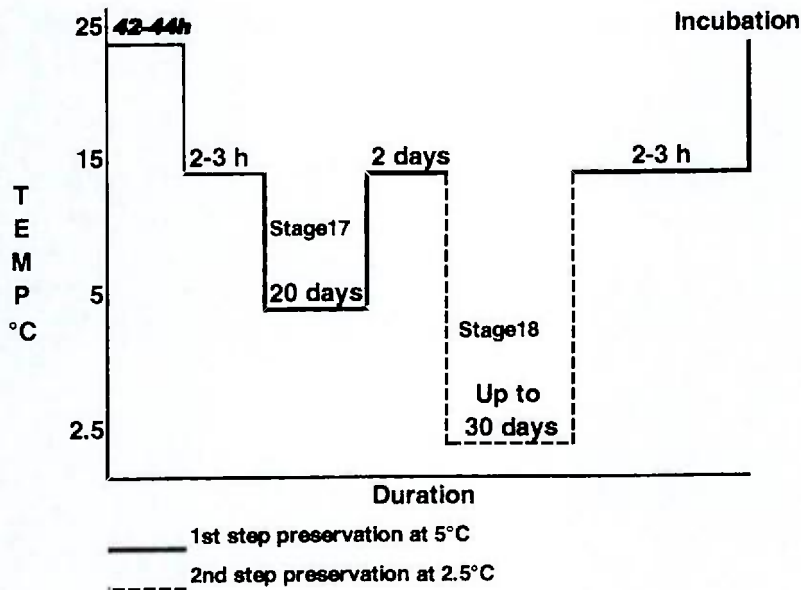


Fig. 3. New cold storage preservation technology for cross breed (PM × CSR2) eggs.

Fig. 3. Nouvelle technologie de conservation au froid pour les oeufs du croisement (PM × CSR2).

mother moth examination, the eggs should be surface sterilized in 2% formalin for 10-15 minutes. The zero hour is fixed after 8h from the decoupling of moths.

The embryonic age of the eggs is calculated from zero hour and 42-44h embryonic aged eggs (Early appendages formation stage) are preserved at 5° C for 20 days followed by an intermediate temperature of 15° C for two days. Then the eggs are re-refrigerated at 2.5° C up to 30 days (double step refrigeration). Both at the time of preservation and release, the eggs are compulsorily passed through 15° C for 2-3h. The released eggs are incubated at optimum temperature and humidity for proper development of eggs. To obtain uniform hatching, the eggs should be black boxed at head pigmentation stage for 48h and exposed to light (about 450 lux) for 2h.

Example,

Coupling time:	6.00 a.m. (07.06.2009)
Decoupling time:	9.00 a.m. (07.06.2009)
Laid on :	07.06.2009
Zero hour:	5 p.m (07.06.2009)
Oviposition duration:	48h (up to 9 a.m. of 09.06.2009)
Embryonic age (stage-17 by 42-44h):	1.00 p.m (09.06.2009)

The eggs should be preserved before 1.00 p.m. at 5° C on 09.06.2009. The eggs can be released on any day during 2nd step refrigeration (2.5° C).

The results of laboratory and field trials prompted us to recommend this technology for preservation of cross breed eggs under Indian conditions for effective utilization.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1995) Improved technologies for silkworm seed production, Silkworm seed Technology Laboratory, Bangalore. P.24-25
- DATTA R. K., SENGUPTA K., BISWAS S.N., (1972) Studies on preservation of multivoltine silkworm eggs at low temperature. Indian J. Seric., 11(1), 22-27.
- FURUSAWA, T., SHIMIZU K., YANO T., (1987) Polyol accumulation in the non- diapause eggs of the silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 56(2), 150-156
- FURUSAWA T., YAGINUMA T., YAMASHITA O., (1992) Temperature—induced metabolic shifts in diapause and non-diapause eggs of the silkworm *Bombyx mori*. Zool. Jb. Physiol., 96, 169-180.
- HIGASHI Y., (1971) A preliminary test on cooling storage of polyvoltine eggs. Bull. Thai. Seric. Res. Trg. Centre, 1, 81.
- HURUKADLI H. K., VEERESHY S., VENKATARAMU., DANDIN S.B., (1998) Safe period of cold storage of multi × bivoltin silkworm *Bombyx mori*. (Lepidoptera : Bombycidae). Eggs for tropics. Indian J. Seric., 37 (2),123-126.
- MANJULA., HURKADLI., (1993) Effect of cold storage of multivoltine and multivoltine x bivoltine eggs, *Bombyx mori* L. at low temperature on hatching performance. Sericologia 33,615-620
- KUMARESHAN P., THANGAVELU K., SINHA R. K., (2004) Studies on long-term preservation of eggs of Indian tropical multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) Genetic resources .Int. J. Indust. Entomol, 9(1), 79-87.
- RAJANNA K. L., JAYARAMA RAJU P., PRABHAKAR C. J., KAMBLE C. K., (2008) Long-term preservation of acid treated bivoltine eggs in silkworm *Bombyx mori* L. Int. J. Indust. Entomol., 17(2), 165-168.
- RAJANNA K. L., JAYARAMA RAJU P., PRABHAKAR C. J., KAMBLE C. K., (2009) Studies on long-term preservation of non-diapause eggs of silkworm *Bombyx mori* L. . Indian J. Seric., 48 (2), 156-161
- TAYEDE D.S., JAWALE M. D., UNCHEGAONIXAR P.K., (1987) Effect of refrigeration on hatchability of eggs of multivoltine race *Bombyx mori* L. Sericologia., 27(2), 297-299.
- VEMANANDA REDDY G., VEERAAIAH T.M., SAMSON M.V., (2004) Silkworm seed preservation schedules for bivoltines-New dimensions. Indian. J. Seric., 43(1), 25-34.
- YAGINUMA T., YAMASHITA O., (1977) Changes in glycogen, sorbitol and glycerol during diapause of the silkworm eggs. J. Seric. Sci. Japan., 46, 5-10.
- YAMASHITA O., HASEGAWA K., (1985) Embryonic diapause. In Comprehensive insect physiological biochemistry and pharmacology (Kerkut, G.A., & Gilbert, L. I. eds), I, pp 407-434. Pergamon, Oxford
- YAMASHITA O., YAGINUMA., T (1991) Silkworm eggs at low temperature: Implications for sericulture. In: Insects at low temperature (Lee Jr. R E and D L Denilinger eds), pp 424-445 Chapman and Hall, Ltd. London

MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE TECHNOLOGIE DE CONSERVATION PAR STOCKAGE AU FROID POUR LES ŒUFS HYBRIDES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. (PM × CSR2)

K. L. RAJANNA¹, G. VEMANDA REDDY¹, V. K. HARLAPUR² & H. K. BASAVARAJA¹

1. Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi, Bangalore - 560 035, Inde.

2. Silkworm Seed Production Centre, Malavally - 571430, Inde.

On a soumis les oeufs hybrides (PM × CSR2) obtenus après 3 h d'accouplement, deux durées de ponte (24 h et 48 h) avec 3 groupes d'âge embryonnaire (24 h, 36 h et 44 h) à une conservation à 5° C avec une réfrigération en une étape et à 5° C et 2,5° C avec une conservation en deux étapes de 30 à 60 jours. Pendant la conservation en deux étapes, on fait passer les œufs par une protection intermédiaire à 15° C pendant deux jours au moment du passage de 5° C à 2,5° C. On sort ces œufs du stockage au froid, on les incube dans des conditions standard, puis on les place dans des boîtes noires et on les expose à la lumière pendant 2 h pour obtenir une éclosion réussie. On identifie le stade embryonnaire 17 pendant la première étape et le stade 18 pendant la deuxième étape de conservation. Les résultats indiquent que la capacité d'éclosion, la perte au premier stade, le rendement en cocons et les caractères du cocon ne sont pas affectés de manière significative chez les lots conservés pendant 50 jours avec une réfrigération en deux étapes par comparaison au témoin. Après des études réussies en laboratoire, cette technologie a été validée au niveau du terrain. Les essais sur le terrain réalisés dans la zone de Chintamani et Malavally dans l'état du Karnataka avec 7426 pontes saines sont encourageants et les résultats sont égaux aux résultats en laboratoire. Cette technologie est donc recommandée pour les producteurs d'œufs hybrides commerciaux pour répondre aux besoins en œufs pendant la période de demande et aussi pour éviter les gaspillages d'œufs (non vendus) pendant la saison creuse.

INTRODUCTION

La sériciculture mûrier est confinée aux conditions tempérées, tropicales et sub-tropicales. Les hybrides bivoltins et polyvoltin × bivoltin sont tous deux exploités pour la production de soie grège. Les races bivoltines pondent des œufs à diapause, qui sont productifs et on peut conserver leurs œufs sans risque de 20 à 300 jours pour en retarder l'éclosion en adoptant des calendriers de conservation adaptés. Différents calendriers de conservation des œufs de vers à soie qui hibernent et méthodes de conservation des œufs à court et à long terme sans dommage physiologique aux œufs ont été étudiés (Vemananda Reddy et coll., 2004). La durée sans risque de stockage au froid des œufs de ver à soie dépend du stade de l'embryon (Yamashita et Yaginuma T., 1991). L'embryogenèse chez le ver à soie a besoin des meilleures conditions éco-physiologiques pour retenir la vigueur des larves venant d'éclore (Yamashita et Hasegawa, 1985). Par ailleurs, on a largement étudié la conversion du glycogène en polyols (sorbitol et glycérol) qui se produit pendant la période de repos et la reconversion des polyols en glycogène au moment de la fin de la diapause, qui est utilisé pour le développement embryonnaire (Yaginuma et Yamashita, 1977 ; Yamashita et Yaginuma, 1991).

La sériciculture tropicale est à tendance polyvoltine, elle est pratiquée pendant toute l'année et on a besoin d'œufs de vers à soie pendant toutes les saisons. Puisque les œufs sont par nature sans diapause, on ne peut pas les conserver pendant une durée plus longue et il y a une limite à la conservation, qui est au maximum de 20 jours. Bien que les œufs sans diapause tolèrent moins le froid, il est souvent inévitable de retarder l'éclosion au-delà de 20 jours en raison de périodes creuses, de changements de saison et de l'absence de feuilles. Plusieurs auteurs ont tenté la réfrigération des œufs sans diapause pour en retarder l'éclosion (Higashi, 1971 ; Datta et coll., 1972 ; Tayade et coll., 1987 ; Manjula et coll., 1993 ; Hurakadli et coll., 1998 ; Kumareshan et coll., 2004 ; Rajanna et coll., 2008 ; 2009). A la différence des bivoltins, la conversion du glycogène en glycérol et en sorbitol commence seulement à faible température chez les œufs sans diapause (Furusawa et coll., 1987), ce qui indique une adaptation en une courte période au stress du froid. Nous avons donc essayé de mettre au point une technique adaptée à la conservation à long terme, en exploitant à la fois le stade embryonnaire et la réfrigération en deux étapes.

MATERIELS ET METHODES

On accouple pendant 3 h des papillons de Pure Mysore et CSR2 ayant émergé de cocons de grainage de qualité (PM × CSR2). Après le désaccouplement, on laisse les femelles pondre dans des conditions standard de température de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et de $75 \pm 5\%$ HR pendant 24 h et 48 h. On entreprend l'étude de la conservation des oeufs hybrides avec les trois traitements suivants :

Traitements :

T1	3 h d'accouplement, 24 h de ponte et 24 h d'âge embryonnaire
T2	3 h d'accouplement, 24 h de ponte et 36 h d'âge embryonnaire
T3	3 h d'accouplement, 48 h de ponte et 44 h d'âge embryonnaire
Témoin	3 h d'accouplement, 48 h de ponte et 50 h d'âge embryonnaire (conservés pendant 20 jours)

On fixe l'heure zéro 8 h après l'heure de désaccouplement quand 85 à 90 % des œufs sont pondus. D'après l'heure zéro, on calcule l'âge embryonnaire des œufs et on conserve les œufs âgés de 24, 36 et 44 h à 5°C .

On conserve les œufs à 5°C de manière continue pendant 30 à 60 jours et on les libère tous les 10 jours pour les trois traitements afin d'étudier l'effet de la réfrigération sur la capacité d'éclosion. Dans un autre lot d'étude, on conserve les œufs pendant 20 jours de stockage initial au froid à 5°C , suivi par une température intermédiaire de 15°C pendant deux jours. Plus tard, on fait passer les œufs à $2,5^\circ \text{C}$ pendant respectivement 10, 20, 30 et 40 jours (réfrigération en deux étapes) pendant une période totale de 60 jours. On fait obligatoirement passer les œufs à 15°C pendant 3 h, à la fois pendant la période de conservation et de libération, pour éviter les dommages provoqués par le froid et le choc thermique (Fig. 1). On incube les œufs libérés à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $75 \pm 5\%$ HR, puis on les place dans une boîte noire et on expose les œufs à la lumière (environ 450 lux) pendant 2 heures pour obtenir une éclosion uniforme. On enregistre l'effet de la réfrigération sur la capacité d'éclosion avec les différents calendriers. On répète cette expérience trois fois avec trois répétitions de 20 pontes saines pour chaque traitement. On réalise des évaluations biologiques dans des conditions de laboratoire pour étudier l'effet de la conservation à long terme des œufs hybrides sur des paramètres d'élevage importants tels que la perte au premier stade (ESL), le taux effectif d'élevage (ERR), le poids du cocon (SCW), le poids de la coque (SSW) et la richesse soyeuse (SP). Après des études réussies en laboratoire, on réalise des essais sur le terrain à grande échelle en utilisant 7426 pontes dans la zone de Chintamani et de Malavally, les zones importantes d'élevage commercial dans l'Etat du Karnataka.

Technique d'isolement de l'embryon :

Pour identifier les stades pendant la réfrigération en une et en deux étapes, on isole les embryons des œufs en adoptant une méthode avec de l'hydroxyde de potassium. On trempe les cartons de ponte dans une solution bouillante avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) entre 2 à 4 % (2 à 4 g / 100 ml d'eau) dans un gobelet pendant 20 à 30 secondes, puis on les lave dans une eau à 60° C. On transfère le contenu dans de l'eau maintenue à température ambiante. Puis, on pulvérise de l'eau en utilisant une pipette Pasteur (compte-gouttes) sur les œufs pour libérer les embryons. Il faut faire attention à ce que le KOH ne dissolve pas les embryons.

Essais sur le terrain :

Pour évaluer la technologie de conservation des œufs hybrides à long terme au niveau du terrain, on réalise quatre essais avec des œufs conservés pendant 20 jours comme témoin pour comparaison. On sélectionne des fermiers au hasard dans 13 villages à Chintamani et dans 9 villages dans la zone de Malavally. On teste une quantité totale de 3 446 pontes saines conservées pendant 50 jours et 3980 pontes saines (témoin) avec respectivement 18 et 17 fermiers.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données concernant la capacité d'éclosion des œufs réfrigérés en une et deux étapes sont présentées dans le Tableau I. L'effet du traitement, de la saison et de l'interaction entre le traitement et la saison est significatif pendant 30 à 60 jours de conservation. Il existe une différence significative de la capacité d'éclosion entre la réfrigération en une et deux étapes à l'exception de la conservation pendant 40 jours sous un traitement de 3 h / 24 h / 36 h, ce qui corrobore les résultats d'études précédentes (Anonyme, 1995). L'éclosion est significativement plus élevée avec des traitements de réfrigération en deux étapes, elle est comprise entre 93 et 93,79 %, avec une augmentation de 17,37 % par rapport à une conservation en une étape de 50 jours. La capacité d'éclosion élevée avec la réfrigération en deux étapes pourrait être principalement due à la rétention des polyols pendant une durée plus longue à 2,5° C qu'à 5° C, ce qui protège les embryons du stress au froid (Furusawa et coll., 1987 et 1992). Ces observations corroborent les résultats antérieurs de Hukadli et coll., (1998) selon lesquels, les œufs du croisement (PM × NB4D2) du groupe d'âge entre 24 - 30 h, 36 - 42 h et 48 - 50 h après la ponte peuvent être stockés au froid sans risque pendant une durée totale de respectivement 75,65 et 54 jours en adoptant une réfrigération en deux étapes.

Les premiers auteurs ont réalisé une étude avec PM × NB4D2, qui n'est pas un hybride très productif par comparaison à PM × CSR2. Cette étude manque de preuve embryonnaire ou de perte au premier stade et de plus ils ont limité leur étude au laboratoire.

Dans notre étude, la performance de stockage au froid des œufs hybrides est appuyée par des études embryonnaires. L'âge embryonnaire au moment de la conservation des œufs à 5° C s'avère être le stade 17 (stade de formation des appendices précoces) et il atteint le stade 18 (stade de formation des appendices avancés), quand on fait passer les œufs à 15° C pendant 2 jours, et ceci est le stade approprié pour faire passer les œufs à 2,5° C et les conserver jusqu'à 30 jours à 2,5° C (Fig. 2). Si l'embryon atteint le stade 19 (raccourcissement de l'embryon), les œufs ne sont pas adaptés à la réfrigération en deux étapes.

Les études d'évaluation biologique qui ont été réalisées pour cinq traitements constitués de durées de ponte et d'âge embryonnaire différents et de différentes durées de conservation des œufs et chez le témoin sont présentées dans le Tableau II. L'effet du traitement et l'interaction entre le traitement et la saison sont significatifs pour tous les paramètres d'élevage. Cependant, l'effet de la saison s'avère significatif sur la capacité d'éclosion, le poids de la larve, le poids du cocon et le poids de la coque. La perte au premier stade est comprise entre 7,69 et 33,12 % et elle baisse de manière significative avec la réfrigération en deux étapes. Les données montrent qu'en adoptant la conservation en deux

étapes, on peut éviter 23,6 % de perte au premier stade, par comparaison à la perte enregistrée avec une réfrigération en une étape, c'est-à-dire 3h / 48 h / 44 h (50). La capacité d'éclosion, l'ERR en nombre, l'ERR en poids, le poids du cocon et le poids de la coque sont significativement plus élevés avec les traitements de réfrigération en deux étapes, c'est-à-dire 3h / 24 h / 24h (20+30), 3h / 24 h / 36 h (20 + 30) et 3h / 48 h / 44 h (20 + 30). Cependant, la richesse soyeuse avec le traitement 3h / 48 h / 44 h n'est pas significativement différente du témoin et elle est significativement plus faible avec les traitements qui restent. La performance comparative des études d'évaluation biologique révèle que les paramètres d'élevage importants tels que le poids larvaire (33,52 ~ 33,60 g), l'ERR en nombre (8635~8640), l'ERR en poids (12,893 ~12,900 kg), le poids du cocon (1,658 ~1,662 g), le poids de la coque (0,321 ~0,323 g) et la richesse soyeuse (19,36 ~19,43 %) avec le traitement de 3h / 48 h / 44 h (20+ 30) ne sont pas significativement différents du témoin (20 jours), ce qui indique l'avantage de la conservation en deux étapes pour maintenir la vitalité des œufs jusqu'à 50 jours.

Validation de la technologie sur le terrain :

Dans le but de la validation sur le terrain, on réalise quatre essais dans 22 villages avec 35 fermiers (Tableau III). Le groupe comprend de gros, de moyens et de petits fermiers et la performance d'élevage s'avère similaire avec tous les fermiers. Les données montrent qu'il n'y a pas de différence considérable pour l'éclosion et le rendement entre le témoin (20 jours) et les œufs conservés pendant une durée plus longue (50 jours).

La nouvelle technologie mise au point pour les œufs hybrides est présentée dans la Fig. 3 avec un exemple. On accouple pendant 3 h les papillons de Pure Mysore et de CSR2 ayant émergé. On désaccouple les papillons et on laisse les femelles pondre à une température et avec une humidité optimales, dans l'obscurité totale pendant 48 h. Après l'examen du papillon mère, il faut stériliser la surface des œufs dans de la formaline à 2 % pendant 10 à 15 minutes. On fixe l'heure zéro huit heures après le désaccouplement des papillons.

On calcule le stade embryonnaire des œufs à partir de l'heure zéro et on conserve les œufs dont l'embryon est âgé de 42 à 44 h (stade de formation des appendices précoces) à 5° C pendant 20 jours, puis à une température intermédiaire de 15° C pendant deux jours. Ensuite, on réfrigère à nouveau les œufs à 2,5° C pendant 30 jours (réfrigération en deux étapes). Pendant la conservation et la libération, on fait obligatoirement passer les œufs à 15° C pendant 2 à 3 h. On incube les œufs libérés à une température et avec une humidité optimales pour le développement correct des œufs. Pour obtenir une éclosion uniforme, il faut placer les œufs dans une boîte noire au stade de pigmentation de la tête pendant 48 h et les exposer à la lumière (environ 450 lux) pendant 2 h.

Exemple,

Période d'accouplement :	6 heures du matin (07.06.2009)
Période de désaccouplement :	9 heures du matin (07.06.2009)
Pondus le :	07.06.2009
Heure zéro :	17 heures (07.06.2009)
Durée de ponte :	48 h (jusqu'à 9 heures du matin le 09.06.2009)
Age embryonnaire (stade 17 au bout de 42-44 h) :	13 heures (09.06.2009)

Il faut conserver les œufs à 5° C avant 13 heures le 09.06.2009. On peut libérer les œufs n'importe quel jour pendant la 2^{ème} étape de réfrigération (2,5° C).

Les résultats des essais en laboratoire et sur le terrain nous amènent à recommander cette technologie pour la conservation des œufs hybrides dans les conditions indiennes pour pouvoir les utiliser efficacement.

FOOD UTILIZATION EFFICIENCY IN *ANTHRAEA MYLITTA* FED ON *TERMINALIA ARJUNA* LEAVES

S. S. RATH*

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi-835 303, Jharkhand (INDIA)
E-mail: ssrathlee@rediffmail.com, ssrathlee_csb@hotmail.com

Antheraea mylitta is an economically important silk producing insect. The nutritional ecology of the insect was studied using *Terminalia arjuna* leaves as the source of food. In order to have a detailed picture of the food utilization, daily measurement of dry matter ingested, faeces produced and biomass gain by the larva were recorded. Absolute value for dry matter ingested, digested, efficiency of conversion of digested food and biomass gain were increased with the advancement of larval development; while, the relative consumption rate declined. The relative growth rate reached its peak during II instar (0.488) and declined significantly thereafter. Results revealed that the larva ingest about 95-96% of their total intake during the last two instars and about 99% during the last three instars and account for a similar biomass production. Male larva expends about 92.38% and female about 89.61% of the digested food towards respiration, moulting, larval-pupal and pupal-adult transformation. A total of 5.94% and 5.47% of the digested dry matter were allotted for silk production by male and female respectively, while only 2.78% was expended for egg production by a female. At the time of death about 1.68% and 2.14% of the digestible food remained in male and in female respectively.

Keywords: *Antheraea mylitta*, *Terminalia arjuna*, food utilization, larva.

INTRODUCTION

Nutrition is a factor of paramount importance that regulates growth, development and reproduction. Intake and growth targets are important to reach the functional optima in an insect (Raubenheimer and Simpson, 1999). The physiological potential of life performance of the insect is always challenged by abundance of food and its quality, various abiotic factors, presence of predators, parasites and disease (Slansky and Scriber, 1985; Rath *et al.*, 2004a, b; Rath, 2005). Food consumption and its utilization influence metabolism, enzyme synthesis, nutrient storage and other activities. *Antheraea mylitta* an economically important silk (tasar silk) producing insect is polyphagous and wild, but two host plants namely, *Terminalia tomentosa* and *T. arjuna* are more suitable for commercial rearing owing to higher survival and growth with superior commercial characters (Rath, 2000; Rath *et al.*, 2006). The quality and quantity of food intake, its digestibility and their utilization influences the growth, developmental time, final weight, survival and above all silk synthesis and reproduction. Quantitative nutrition in *A. mylitta* was a subject of interest of many (Ojha *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2000; Rath *et al.*, 2006) but only one detailed report on food allocation budget is available where the food plant *Terminalia tomentosa* was used as the source of food (Rath *et al.*, 2003b). *T. arjuna* being another suitable host plant of the insect it is felt necessary to have a complete and

* Present address: Sudhansu Sekhar Rath, Basic Seed Multiplication and Training Centre, Central Silk Board, P.O. Kerai, Sundargarh-770073 (Odisha, India) Email: ssrathlee@rediffmail.com, ssrathlee_csb@hotmail.com

comparative picture of nutritional budget which is the aim of the present investigation. Simultaneously emphasis was also given to find out the dry matter utilization, dry matter economy, and dry matter requirement for unit growth, cocoon shell and egg production in *A. mylitta*.

MATERIALS AND METHODS

Antheraea mylitta (Lepidoptera: Saturniidae; ecorace: Daba bivoltine) was selected because of their higher exploitation potency. Leaves of host plant *Terminalia arjuna* were preferred as the source of food for the insect which is next to *T. tomentosa* with respect to nutritional status of the host plant that support the growth of the larvae better (Sinha *et al.*, 1992; Rath, 2000; Rath *et al.*, 2006). Evaluation of food consumption and utilization in this insect in *in situ* condition (*i.e.*, the out door condition on the host plant) is restricted by the wild nature of the larva and also by a number of other factors like natural calamity, and presence of pest, predator and parasites. Secondary contamination with protozoan disease called 'pebrine' caused by *Nosema sp.* and parasitic infestation by uzi fly influence the food consumption and utilization to a great extent (Rath *et al.*, 2000, 2003a, Rath and Sinha, 2005). To overcome such situations *ex situ* conditions (indoor rearing) was given preference to study the quantitative aspect of food consumption, utilization and nutrient economy.

Freshly hatched out healthy *A. mylitta* larvae were reared in indoor condition (temperature $28^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ and R.H. $77\% \pm 7\%$, photoperiod 11h L: 13h D). The silkworms were fed with sufficient quantities of fresh *T. arjuna* leaves twice a day to attain full growth and maturity (Rath, 2005; Rath *et al.*, 2006).

There were 7 replications each with 20 larvae. Buffer stocks were maintained *at par* simultaneously to compensate mortality. Larvae of same age and weight from the buffer stock were used to replace the loss due to mortality and larvae used for dry weight determination. Leaves and faeces were kept at 80°C in an oven to determine the dry weight. Larvae of known weight were killed by placing them in a freezer for a short time and then dried in an oven at 80°C to a constant weight. Thus, for each day of feeding period dry matter ingested, digested, faeces produced and increase in larval weight were recorded. Sex could not be separated up to IV instar in the present study but separate records were kept for different sexes during V instar. The data recorded during first four instars were common for both the sexes. After gut purging the worms were mounted on the bushes of *T. arjuna* outdoor for spinning of cocoons. The harvested cocoons were kept separately till the reproductive activity were completed, and the commercial (cocoon weight and shell weight) and adult characters (moth weight, fecundity and egg weight) were recorded.

For dry weight determination 5 each of larvae, pupae, moths, and 100 eggs were used and dry matter requirement for unit growth, cocoon shell and egg production were calculated; and dry matter economy was constructed for male and female separately.

The various nutritional parameters were recorded and expressed on dry weight basis (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%) = $100P/E$, efficiency of conversion of digested food (ECD%) = $100P(E - F)$ [where A is mean dry weight of the larvae during the feeding period; E, the dry weight of food eaten; F, dry weight of faeces produced; P, dry weight gain of the larva; and T, duration feeding (days)].

Students t-test was used to study the sex difference in various parameters while the significant different of different parameters among instars were studied using ANOVA and correlation.

RESULTS

The newly hatched *A. mylitta* larva (dry weight 0.002 g) continue feeding on the leaves of host plant till maturation and recorded a dry weight gain of about 7.91 g in male and 9.04 g in female. The

male larvae increased by 4700 times while a female increased by 5490 times during the entire larval span. The absolute value of ingestion and digestion increases significantly with the advancement of developmental stages ($P < 0.001$) but the relative consumption rate (RCR) declined significantly ($P < 0.001$) from early (3.051 during I instar) to late instars (0.595 in male and 0.527 in female during V instar). The RCR differ significantly among the instars. The ingestion and digestion though did not change significantly among the first two instars, in the late instars it differs significantly. The approximate digestibility (AD%) declined significantly up to III instar followed by a significant and temporary increase during IV instar and then declined to its lowest level during V instar (34.5% in male and 40.57% in female). The efficiency of conversion of ingested food (ECI %) tends to increase significantly up to IV instar followed by a significant decline during V instar, while the efficiency of conversion of digested food (ECD%) increased with advancement of development up to V instar ($P < 0.001$). Absolute biomass gain increases significantly as development proceeds but the relative growth rate (RGR) reaches its peak during II instar (0.488) and then declined to the lowest during V instar (0.087 in male and 0.077 in female) (Table I).

Significant sexual differences were observed in all the parameters (except ECI %) during V instar and when the entire larval stage was taken into account. While the values for the parameters like feeding period, food ingested, digested, AD%, biomass gain were significantly higher in female, in other parameters male excels the female (Table I).

The percentage of total ingestion, digestion and biomass production increases gradually as the development proceeds. The larva ingest about 95-96% of their total intake during the last two instars and about 99% during the last three instars and accounts for a similar biomass production. Male recorded higher percentage of total ingestion, digestion and biomass production during different instars than their female counterparts till the larvae reached IVth instar but these parameters recorded for female excel the males during V instar (Table II).

The dry matter economy in *A. mylitta* fed with *T. arjuna* leaves revealed that the female larvae ingests and digests more to a tune of about 16% and 28% respectively than male. Female always excels male in conversion of assimilated food into larva (14.3%), pupa (92.05%) and moth (10.45%). But the total expenditure on various life activities in male is higher than female. From the time of first feeding to completion of reproductive activities about 92.38% and 89.61% of digested food were expended for respiration, moulting, larva-pupa and pupa-adult transformation in male and female respectively. The mature larva retains about 36% and 40% of the assimilated food in female and male respectively. Male larvae shares about 5.94% of digestible food for cocoon shell production while the female contribute only 5.47% leaving 7.66% and 11.5% for pupa in male and female respectively. The female diverts about 2.78% of digestible matter towards egg production. At the time of death male retains only 1.68% of digestible food, while it constitutes 2.14% in female (Table III).

The dry matter requirement of ingested and digested food for unit growth, cocoon shell production and egg production revealed that for tissue growth of 1 g the larva require ingesting about 6.2 to 6.3 g of dry matter which equals to 2.5 to 2.8 g of digested food. While both male and female require about 41-42 g of dry matter ingesta for production of 1 g cocoon shell, the digesta requirement in female (18.27 g) was higher than that of male (16.84 g). The female larva requires ingesting 81 g dry matter for production of 1 g of egg that equals to 36 g of digesta (Table IV).

Table I. Dry matter ingested, digested, biomass produced and its utilization efficiency in different instars of tropical tasar silkworm *A. mylitta* fed with *T. arjuna*.**Tableau I. Matière sèche ingérée, digérée, biomasse produite et efficacité d'utilisation pendant les différents âges chez le ver à soie tasar tropical, *A. mylitta* nourri sur *T. arjuna*.**

Parameters	Larval stage					Entire larval stage	
	I	II	III	IV	V		
Paramètres	Stade larvaire					Ensemble du stade larvaire	
	I	II	III	IV	V	Correlation (r)	
Feeding period (days) <i>Durée d'alimentation (jours)</i>	4.2	3	3.7	7.6	M 12.6 F 15.4		M 31.1 F 33.9*
Food ingested (g) <i>Alimentation ingérée (g)</i>	0.120 a	0.536 a	1.768 b	8.236 c	M 38.23 d F 46.04 e	M 0.8156*** F 0.7994***	M 48.89 F 56.70*
RCR	3.051 a	2.871 b	1.760 c	0.795 d	M 0.595 e F 0.527 f	M -0.9617*** F -0.9652***	M 0.398 F 0.370*
Food digested (g) <i>Alimentation digérée (g)</i>	0.083 a	0.330 a	0.955 b	5.159 c	M 13.17 d F 18.68 e	M 0.8799*** F 0.8403***	M 19.70 F 25.21 *
AD%	69.09 a	61.51 b	54.08 c	62.66 b	M 34.50 d F 40.57 e	M -0.7962*** F -0.7979***	M 40.29 F 44.46*
Biomass gain (g) <i>Gain de biomasse (g)</i>	0.015 a	0.091 a	0.329 b	1.682 c	M 5.61 d F 6.74 e	M 0.8605*** F 0.8412***	M 7.91 F 9.04 *
ECI%	12.22 a	17.09 b	18.66 c	22.60 d	M 14.73 e F 14.65 e	M 0.4062 (P, NS) F 0.4025 (P, NS)	M 16.18 F 15.94 (P, NS)
ECD%	17.70 a	27.80 b	34.49 c	36.07 c	M 42.66 d F 36.13 c	M 0.9564*** F 0.8862***	M 40.16 F 35.86*
RGR	0.372 a	0.488 b	0.327 c	0.179 d	M 0.087 e F 0.077 f	M -0.8725*** F -0.8746***	M 0.064 F 0.059*

M: Male / Mâle, F: Female / Femelle. Different alphabets show significant difference among different instars at 5% level (one way ANOVA). / Les différentes lettres montrent une différence significative entre les différents âges au seuil de 5 % (ANOVA à un facteur).

* Significant at 5% (t-test) / Significatif au seuil de 5 % (test t) *** Significant at 0.1% / Significatif au seuil de 0,1 %.

Table II. Percentage of ingestion, digestion and biomass production during different instars of *A. mylitta*.

Tableau II. Pourcentage d'ingestion, de digestion et de production de biomasse pendant les différents âges larvaires d'*A. mylitta*.

	(Instar) % of total during entire larval life					
	Ingestion		Digestion		Biomass production	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
	% de chaque âge par rapport au total pendant toute la durée larvaire					
	Ingestion		Digestion		Production de biomasse	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
I	0.25	0.21	0.42	0.33	0.19	0.17
II	1.10	0.95	1.68	1.31	1.15	1.01
III	3.62	3.12	4.85	3.79	4.16	3.64
IV	16.85	14.53	26.19	20.47	23.54	20.60
V	78.20	81.20	66.85	74.11	70.96	74.56

DISCUSSION

Antheraea mylitta, like other lepidopteron insect is highly specialized for rapid growth primarily achieved by a higher rate of food acquisition. The feeding behaviour is adapted to maximise the rate at which the nutrition is absorbed from the gut and thus maximum rate the growth is achieved (Reynold *et al.*, 1985) although this leads to lower the efficiency of food utilization. In the present study, we have observed a remarkable increase in larval weight by 4700 to 5490 times during the entire larval span following an increase in food acquisition by 319 to 383 times which leads to an increase in the digestion by 159 to 225 times. In contrast, *A. mylitta* fed with leaves of *T. tomentosa* registered an increase in larval weight by 5215 to 6260 times during its entire larval span with the help of 322 to 387 times increase in ingestion followed by 162 to 254 times increase in digestion. In every instar the larval weight in *T. tomentosa* fed ones registered higher growth (in dry mass) than *T. arjuna* fed ones (present observation) [during I instar it was 0.004 g, in II 0.058 g, in III 0.267 g, in IV 0.221 g, in V (male) 0.075 g and in V (female) 0.513 g] (Rath *et al.* 2003 b). *Antheraea mylitta* silkworm larvae show an accelerating rate of absolute growth being highest (71 to 75% of the total biomass gain) during the V instar. This absolute growth remains concealed if only RGR is described which fell continuously from I to V instar after reaching a peak during II instar. During the period of V instar development (which is longer comparatively) the value of this index also witnessed a declining trend which implies that the larger animals put relatively less effort into growth than the smaller ones, despite the maintenance of a high absolute growth rate as also evidenced from earlier studies (Reynolds *et al.*, 1985; Rath *et al.*, 2003b). The larger proportions of digested food (67 to 74% of total) are available during the V instar for the higher tissue growth and to meet highest metabolic cost during silk protein synthesis and egg production.

Table III. Dry matter economy in tropical tasar (*A. mylitta*) fed with *T. arjuna* leaves.
Tableau III. Bilan en matière sèche chez le tasar tropical (*A. mylitta*) nourri avec des feuilles de *T. arjuna*.

Sl. No	Parameters	Sex	Dry matter (g) per larva	Performance of female over male (%)
No. d'ordre	Paramètres	Sexe	Matière sèche (g) par larve	Performance de la femelle par rapport au mâle (%)
1.	Ingestion of dry matter during the entire larval period <i>Ingestion de matière sèche pendant toute la période larvaire</i>	Male Female	48.89 56.70	+ 15.97*
2.	Assimilation of dry matter during the entire larval period <i>Assimilation de matière sèche pendant toute la période larvaire</i>	Male Female	19.70 (100%) 25.21 (100%)	+ 27.97*
3.	Consumption of dry matter during the entire larval period in moulting, respiration etc. <i>Consommation de matière sèche pendant toute la période larvaire en mue, en respiration, etc..</i>	Male Female	11.79 (59.85%) 16.17 (64.14%)	+ 37.15*
4.	Gain in dry weight by the larva during its entire larval period <i>Gain de poids sec par la larve pendant toute sa période larvaire</i>	Male Female	7.91 (40.15%) 9.04 (35.86%)	+ 14.28*
5.	Consumption of dry matter from initiation of cocoon shell formation to larval-pupal ecdysis <i>Consommation de matière sèche du début de la formation de la coque soyeuse à l'ecdysie larve-chrysalide</i>	Male Female	5.23 (26.55%) 4.76 (18.88%)	- 8.99*
6.	Conversion dry matter into cocoon shell / <i>Conversion de matière sèche en coque soyeuse</i>	Male Female	1.17 (5.94%) 1.38 (5.47%)	+ 17.95*
7.	Conversion dry matter into pupa / <i>Conversion de matière sèche en chrysalide</i>	Male Female	1.51 (7.66%) 2.90 (11.50%)	+ 92.05*
8.	Consumption of dry matter during pupa stage <i>Consommation de matière sèche pendant le stade de la chrysalide</i>	Male Female	0.74 (3.76%) 1.35 (5.36%)	+ 82.43*
9.	Conversion of dry matter into egg by the female larva / <i>Conversion de matière sèche en oeufs par la larve femelle</i>	Female	0.70 (2.78%)	
10.	Conversion of dry matter into moth (excluding egg in female) <i>Conversion de matière sèche en papillon (en excluant l'oeuf chez la femelle)</i>	Male Female	0.77 (3.91%) 0.85 (3.37%)	+ 10.38*
11.	Consumption of dry matter by the moth / <i>Consommation de matière sèche par le papillon</i>	Male Female	0.44 (2.23%) 0.31 (1.23%)	- 29.54*
12.	Residual dry matter at the time of death / <i>Matière sèche résiduelle au moment de la mort</i>	Male Female	0.33 (1.68%) 0.54 (2.14%)	+ 63.64*

*Significant at 5% level. / *Significatif au seuil de 5 %. Male / Mâle. Female / Femelle.

Table IV. Dry matter requirement for growth, cocoon shell and egg production in *A. mylitta* fed with *T. arjuna*.

Tableau IV. Besoins en matière sèche pour la croissance, la coque soyeuse et la production d'oeufs chez *A. mylitta* nourri avec *T. arjuna*.

Parameters	Dry matter requirement (g/g)	
	Male	Female
Paramètres	Besoins en matière sèche (g / g)	
	Mâle	Femelle
Ingesta (g) / growth (g) / Ingesta (g) / croissance (g)	6.18	6.27
Digesta (g) / growth (g) / Digesta (g) / croissance (g)	2.49	2.79
Ingesta (g) / cocoon shell (g) / Ingesta (g) / coque soyeuse (g)	41.79	41.09
Digesta (g) / cocoon shell (g) / Digesta (g) / coque soyeuse (g)	16.84	18.27
Ingesta (g) / egg production (g) / Ingesta (g) / production d'oeufs (g)	-	81.00
Digesta (g) / egg production (g) / Digesta (g) / production d'oeufs (g)	-	36.01

In the present study, the rate of dry matter intake (RCR) declined with advancement of larval development, while corresponding ECI (except in V instar) and ECD increased which is corroborated with the earlier findings (as summarized in Waldbauer, 1968) which maintained the larval growth. The decline in RCR might be due to shorter residence time of food in the gut in younger larvae (Slansky and Scriber, 1985).

The proportional food intake during different larval instars revealed that about 95-96% of the total intake of dry matter was ingested during the last two instars and account for a 99% during last three instars of *A. mylitta*. *Bombyx* and *Protoparce*, both lepidopteran leaf feeders eat about 97% of their total intake during last two instars and about 99% during last three instars confirms our findings (as summarized in Waldbauer, 1968) and in *A. mylitta* fed with *Terminalia tomentosa* (Rath *et al.*, 2003b).

Approximate digestibility declines with age in *A. mylitta* so as in many other insects (as summarized in Waldbauer, 1968). In contrast, Kasting and McGinnis (1959) have reported a more or less constant AD in *Agrotis* during last three instars of development. The reason behind decline in AD though not clear is attributed to the enormous growth of the larva. Further the decline in AD with age in this insect might be due to the consumption of a higher proportion of indigestible fibre during the final instar (V instar).

Female larva ingest 16% more than male and digests 28% more in *A. mylitta* and also has significantly AD% value than male, but at the same time female registered a lower ECD value leading to lower growth rate. The results confirmed the earlier findings in the same insect with *T. tomentosa*

as the source of food (Rath *et al.*, 2003b). In contrast, no sex differences in the values for AD, ECI and ECD was reported during the V instar development of *B. mori* (Hiratsuka, 1920; Legay, 1958).

A. mylitta retained 40% and 36% of assimilated food as matured larva in male and female respectively. About 5.94% of assimilated food in male and 5.47% in female were diverted for silk production and 2.8% for egg production, in contrast *B. mori* spends 20% for silk production and 12% for egg production. At death the *A. mylitta* female retained 2.14% and male 1.68% of assimilated food while in *B. mori* the female retained 14% and male 25% of assimilated food at the time of death. *A. mylitta* exhausted 89-92% assimilated food for respiration, moulting, larva-pupa and pupa-adult transformations which is comparable to the total expenditure of 90-91% in the same insect fed with *T. tomentosa* (Rath *et al.*, 2003b), in contrast only 52% was spent in *B. mori* (Hiratsuka, 1920) which may be attributed to the wild nature of *A. mylitta* which is comparatively less efficient in converting the assimilated food into growth and production of silk and eggs.

REFERENCES

- HIRATSUKA E. (1920) Researches on the nutrition of silkworm. Bull. Ser. Exp. Sta. Japan. 1: 257-315.
- KASTING R & MCGINNIS A. J. (1959) Nutrition of pale western cutworm *Agrotis orthogonia* Morr (Lepidoptera: Noctuidae) II Dry matter and nitrogen economy of larvae fed on sprouts of hard red spring and durum wheat. Can. J. Zool. 37: 713-720.
- LEGAY J. M. (1958) Recent advances in silkworm nutrition. A. Rev. Ent. 3: 75-86.
- OJHA N.G., SHARAN S. K., RAI S. & PANDEY P.N. (2000) Studies on the sexwise consumption and utilization of the leaves of different food plants in different ecoraces of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury during fifth instar of the first crop. Int. J. Wild Silkworm & Silk 5: 241-245.
- RATH S. S. (2000) Studies on growth and development of *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) fed on three different natural host plants. Int. J. Wild Silkworm & Silk 5: 99-103.
- RATH S. S. (2005) Effect of quantitative nutrition on adult characters and reproductive fitness in tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*. Int. J. Indust. Entomol. 10: 19-24.
- RATH S.S. & SINHA B. R. R. P. (2005) Parasitization of fifth instar tasar silkworm, *Antheraea mylitta*, by the 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., NARAIN R. & PRASAD B.C. (2004b) Impacts of physiological condition of fifth instar larvae of *Antheraea mylitta* on rate of feeding and assimilation and its nutritional requirements. Proc. Nat. Acad. Sci. India 74B (III) & (IV): 237-243.
- RATH S. S., PRASAD B. C. & SINHA B. R. R. P. (2003a) 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: 1-9.
- 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 Silkworm & Silk 5: 179-103.
- RATH S. S., SINGH M. K., SURYANARAYANA N. (2006) Changes in rate of feeding and assimilation in *Antheraea mylitta* fed on two major food plants and its effect on silk production and reproduction. Agriculture Journal (Medwell Online) 1: 24-27.
- RATH S. S., SINHA B. R. R. P. & THANGAVELU K. (2004a) Nutritional efficiency in *Antheraea mylitta* D. during food deprivation. Int. J. Indust. Entomol. 9: 111-115.
- RATH S. S., NARAIN R., PRASAD B.C., ROY G.C. & SINHA B.R.R.P. (2003b). Food allocation budgeting in tropical tasar, *Antheraea mylitta* fed on *Terminalia tomentosa*. Sericologia 43: 557-564.
- RAUBENHEIMER D. & SIMPSON S.J. (1999) Integrating nutrition: a geometrical approach. Entomol. Exp. Appl. 91: 67-82.

- REYNOLDS S.E., NOTTINGHAM S.F. & STEPHENS A.E. (1985) Food and water economy and its relation to growth in fifth instar larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J Insect Physiol. 31: 119-127.
- SINHA U.S.P., SINHA A.K., SRIVASTAVA P.P., BRAHMACHARI B.N. (1992) Studies on the variation in chemical constituents in relation to maturity of leaves in three primary food plants of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. Indian J. Seric. 31: 83-86.
- SINHA U. S. P., BAJEPEYI C. M., SINHA A. K., BRAHMACHARI B. N. & SINHA B. R. R. P. (2000) Food consumption and utilization in *Antheraea mylitta* Drury larvae; Int. J. Wilkd Silkmoth & Silk 5: 182-186.
- 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. 87-163, Pergamon Press, Oxford.
- WALDBAUER G.P. (1968) The consumption and utilization of food by insects. Adv. Insect Physiol. 5:229-288.

EFFICACITE D'UTILISATION DE LA NOURRITURE CHEZ *ANTHERAEA MYLITTA* NOURRI SUR DES FEUILLES DE *TERMINALIA ARJUNA*

S. S. RATH*

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi 835 303, Jharkhand (Inde).
Email : ssrathlee@rediffmail.com, ssrathlee_csb@hotmail.com

Antheraea mylitta est un insecte produisant de la soie important sur le plan économique. On a étudié l'écologie nutritionnelle de l'insecte en utilisant les feuilles de *Terminalia arjuna* comme source de nourriture. Pour avoir un aperçu détaillé sur l'utilisation de nourriture, on a procédé à une mesure quotidienne de la matière sèche ingérée, des matières fécales produites et du gain de biomasse par les larves. La valeur absolue par rapport à la matière sèche ingérée, digérée, à l'efficacité de conversion de la nourriture digérée et au gain de biomasse augmente avec la progression du développement larvaire, tandis que le taux de consommation relative diminue. Le taux de croissance relative atteint son sommet pendant le 2^{ème} âge (0,488) et baisse significativement ensuite. Les résultats révèlent que la larve ingère environ 95 à 96 % de son ingestion totale pendant les deux derniers âges et environ 99 % pendant les trois derniers âges et cela représente une production de biomasse similaire. La larve mâle consacre environ 92,38 % et la larve femelle environ 89,61 % de la nourriture digérée à la respiration, à la mue et à la transformation larve-nymph et nymphe –adulte. Un total de 5,94 % et de 5,47 % de matière sèche ingérée est utilisé pour la production de soie respectivement par le mâle et par la femelle, tandis qu'il n'y a que 2,78 % qui sont consacrés à la production d'œufs par la femelle. Au moment de la mort, environ 1,68 % et 2,14 % de la nourriture digérée reste respectivement dans le mâle et dans la femelle.

INTRODUCTION

La nutrition est un facteur d'une importance primordiale qui régule la croissance, le développement et la reproduction. Les objectifs de consommation et de croissance sont importants pour atteindre les optima fonctionnels chez un insecte (Raubenheimer et Simpson, 1999). Le potentiel physiologique de la performance vitale de l'insecte est toujours remis en question par l'abondance et la qualité de la nourriture, par des facteurs abiotiques différents et par la présence de prédateurs, de parasites et de maladies (Slansky et Scriber, 1985 ; Rath et coll., 2004a ; Rath, 2005). La consommation de nourriture et son utilisation influencent le métabolisme, la synthèse des enzymes, le stockage des nutriments et d'autres activités. *Antheraea mylitta*, un insecte produisant de la soie (soie tasar) important sur le plan économique est polyphage et sauvage, mais deux plantes hôtes à savoir, *Terminalia tomentosa* et *T. arjuna* sont plus adaptées à l'élevage commercial en raison de leur survie et de leur croissance plus importantes et de leurs caractères commerciaux supérieurs (Rath, 2000 ; Rath et coll., 2006). La qualité et la quantité de nourriture consommée, sa digestibilité et son utilisation influencent la croissance, la durée du développement, le poids final, la survie et par-dessus tout la synthèse de la soie et la reproduction. La nutrition quantitative chez *A. mylitta* est un sujet d'intérêt pour beaucoup (Ojha et coll., Sinha et coll., 2000 ; Rath et coll., 2006) mais il n'existe qu'un

* Adresse actuelle : Sudhansu Sekhar Rath, Basic Seed Multiplication and Training Centre, Central Silk Board, P. O. Kerai, Sundargarh – 770073 (Odisha, Inde) Email: ssrathlee@rediffmail.com, ssrathlee_csb@hotmail.com

rapport détaillé sur le bilan d'affectation de la nourriture où la plante hôte *Terminalia tomentosa* est utilisée comme source de nourriture (Rath et coll., 2003b).

T. arjuna étant une autre plante hôte adaptée pour l'insecte, il a été ressenti nécessaire d'avoir un panorama complet et comparatif sur le bilan nutritionnel, d'où cette étude. Parallèlement, on s'est aussi attaché à trouver quelle était l'utilisation de la matière sèche, le bilan en matière sèche et le besoin en matière sèche pour une unité de croissance, pour la coque soyeuse et pour la production d'œufs chez *A. mylitta*.

MATERIELS ET METHODES.

On a sélectionné *Antheraea mylitta* (Lépidoptère : Saturniidés ; écorace : Daba bivoltine) en raison de son potentiel d'exploitation supérieur. On préfère les feuilles de la plante hôte *Terminalia arjuna*, qui suit *T. tomentosa* par rapport à son statut nutritionnel de plante hôte soutenant le mieux la croissance des larves (Sinha et coll., 1992 ; Rath, 2000 ; Rath et coll., 2006), comme source de nourriture pour l'insecte. L'évaluation de la consommation de nourriture et son utilisation chez cet insecte dans des conditions *in situ* (c'est-à-dire les conditions à l'extérieur sur la plante hôte) est limitée en raison de la nature sauvage des larves et aussi en raison d'un certain nombre d'autres facteurs comme les calamités naturelles et la présence d'insectes, de prédateurs et de parasites. La contamination secondaire par la maladie protozoaire appelée « la pébrine » provoquée par *Nosema* sp. et l'infestation parasitaire par la mouche uzi influencent dans une large mesure la consommation et l'utilisation de nourriture (Rath et coll., 2000, 2003a, Rath et Sinha, 2005). Pour faire face à des situations de ce type, on a préféré des conditions *ex situ* (élevage à l'intérieur) pour étudier les aspects quantitatifs de la consommation, de l'utilisation de nourriture et du bilan en nutriments.

On élève des larves *A. mylitta* saines venant d'éclore (température $28^{\circ} \pm 3^{\circ}$ et H. R. $77\% \pm 7\%$, photopériode 11 h L : 13 h O) à l'intérieur. On nourrit les vers à soie avec des quantités suffisantes de feuilles fraîches de *T. arjuna* deux fois par jour pour qu'ils atteignent leur pleine croissance et leur maturité (Rath, 2005 ; Rath et coll., 2006).

Il y a 7 répétitions de 20 larves chacune. On maintient des stocks tampons égaux parallèlement pour compenser la mortalité. On utilise des larves du même âge et du même poids du stock tampon pour remplacer les pertes dues à la mortalité et les larves utilisées pour la détermination du poids sec. On conserve les feuilles et les excréments à 80°C dans un four pour déterminer le poids sec. On tue les larves de poids connu en les plaçant dans un congélateur pendant une courte période, puis on les sèche dans un four à 80°C jusqu'à un poids constant. On enregistre donc pour chaque jour d'alimentation, la matière sèche ingérée, digérée, les excréments produits et l'augmentation du poids larvaire. Dans cette étude, on n'a pas pu séparer les sexes jusqu'au 4^{ème} âge, mais on conserve des données séparées pour les différents sexes pendant le 5^{ème} âge. Les données enregistrées pour les quatre premiers âges sont communes aux deux sexes. Après leur avoir purgé l'intestin, on monte les vers sur des buissons de *T. arjuna* à l'extérieur pour le filage des cocons. On conserve les cocons recueillis séparément jusqu'à ce que l'activité de reproduction soit terminée et on enregistre les caractères commerciaux (poids du cocon et de la coque) et adultes (poids du papillon, fécondité et poids de l'œuf).

Pour la détermination du poids sec, on utilise 5 larves, chrysalides, papillons et 100 œufs et on calcule le besoin en matière sèche pour une unité de croissance, pour la coque soyeuse et pour la production d'œufs et on établit le bilan en matière sèche séparément pour les mâles et les femelles.

On enregistre les différents paramètres nutritionnels et on les exprime sur la base du poids sec (Waldbauer, 1968) c'est à dire : le taux de croissance relatif (RGR) = P / TA , le taux de consommation relatif (RCR) = E / TA , la digestibilité approximative (% AD) = $100 (E - F) / E$, l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (% ECI) = $100 P / E$ et l'efficacité de conversion de la nourriture digérée (% ECD) = $100P (E - F)$ [où A est le poids sec moyen des larves pendant la durée

d'alimentation ; E, le poids sec de la nourriture consommée ; F, le poids sec des matières fécales produites ; P, le gain de poids sec des larves et T, la durée d'alimentation (jours)].

On utilise le test t de Student pour étudier la différence due au sexe pour différents paramètres, tandis qu'on étudie la différence significative de différents paramètres entre les âges en utilisant l'ANOVA et la corrélation.

RESULTATS

Les larves d'*A. mylitta* venant d'éclore (poids sec 0,002 g) continuent à se nourrir sur les feuilles de la plante hôte jusqu'à leur maturation et enregistrent un gain de poids sec d'environ 7,91 g chez le mâle et de 9,04 g chez la femelle. La larve mâle augmente 4700 fois, tandis qu'une femelle augmente 5490 fois pendant toute sa durée larvaire. La valeur absolue d'ingestion et de digestion augmente significativement avec la progression des étapes de développement ($P < 0,001$), mais le taux de consommation relatif (RCR) baisse significativement ($P < 0,01$) des premiers (3,051 pendant le 1^{er} âge) aux derniers âges (0,595 chez le mâle et 0,527 chez la femelle pendant le 5^{ème} âge). Le RCR diffère significativement entre les âges. L'ingestion et la digestion ne changent pas significativement entre les deux premiers âges, cependant pendant les derniers âges elles diffèrent de manière significative. La digestibilité approximative (% AD) baisse significativement jusqu'au 3^{ème} âge, suivie par une augmentation significative et temporaire pendant le 4^{ème} âge, puis elle baisse à son niveau le plus bas pendant le 5^{ème} âge (34,5 % chez le mâle et 40,57 % chez la femelle). L'efficacité de conversion de la nourriture ingérée (% ECI) tend à augmenter de manière significative jusqu'au 4^{ème} âge, suivie par une baisse significative pendant le 5^{ème} âge, tandis que l'efficacité de conversion de la nourriture digérée (% ECD) augmente avec la progression du développement jusqu'au 5^{ème} âge ($P < 0,001$). Le gain de biomasse absolue augmente de manière significative alors que le développement avance, mais le taux de croissance relative (RGR) atteint son sommet pendant le 2^{ème} âge (0,488), puis il baisse à son niveau le plus bas pendant le 5^{ème} âge (0,087 chez le mâle et 0,077 chez la femelle) (Tableau I).

On observe une différence sexuelle significative pour tous les paramètres (sauf le % ECI) pendant le 5^{ème} âge et quand on prend en compte toute le stade larvaire. Tandis que les valeurs pour les paramètres comme la durée d'alimentation, la nourriture ingérée, digérée, le % AD, le gain de biomasse sont significativement plus élevés chez la femelle, pour les autres paramètres, le mâle dépasse la femelle (Tableau I).

Le pourcentage d'ingestion, de digestion et de production de biomasse totales augmente progressivement alors que le développement progresse. Les larves ingèrent environ 95 à 96 % de leur ingestion totale pendant les deux derniers âges et environ 99 % pendant les trois derniers âges, ce qui représente une production de biomasse similaire. Le mâle enregistre un pourcentage plus élevé d'ingestion, de digestion et de production de biomasse totales pendant les différents âges que ses homologues femelles jusqu'à ce que la larve atteigne le 4^{ème} âge, mais les mêmes paramètres enregistrés pour la femelle dépassent les mâles pendant le 5^{ème} âge (Tableau II).

Le bilan en matière sèche chez *A. mylitta* nourri avec des feuilles de *T. arjuna* montre que la larve femelle ingère et digère plus que le mâle, respectivement 16 % et 28 %. La femelle dépasse toujours le mâle dans la conversion de la nourriture assimilée en larve (14,3 %), en chrysalide (92,05 %), et en papillon (10,45 %). Mais la dépense totale dans différentes activités vitales est plus élevée chez le mâle que chez la femelle. A partir du moment du premier repas jusqu'à l'achèvement des activités reproductives, environ 92,38 % et 89,61 % de la nourriture digérée sont consacrés à la respiration, à la mue, à la transformation larve- nymphe et nymphe – adulte chez respectivement le mâle et la femelle. La larve mûre retient environ 36 % et 40 % de la nourriture assimilée respectivement chez le mâle et la femelle. La larve mâle consacre environ 5,94 % de la nourriture digérée pour la production de coque soyeuse tandis que la femelle y consacre seulement 5,47 %, ce qui laisse 7,66 % et 11,5 %

pour la chrysalide respectivement chez le mâle et la femelle. La femelle détourne environ 2,78 % de la matière digestible envers la production d'œufs. Au moment de la mort, le mâle retient seulement 1,68 % de la nourriture digérée, tandis que cela représente 2,14 % chez la femelle (Tableau III).

Le besoin en matière sèche de nourriture ingérée et digérée pour une unité de croissance, pour la production de coque soyeuse et pour la production d'œufs montre que pour une croissance des tissus d'1 g, la larve a besoin d'ingérer environ 6,2 à 6,3 g de matière sèche, ce qui équivaut à 2,5 – 2,8 g de nourriture digérée. Alors qu'à la fois le mâle et la femelle ont besoin de 41 à 42 g d'ingesta de matière sèche pour la production d'1 g de coque soyeuse, le besoin en digesta chez la femelle (18,27 g) est plus élevé que celui du mâle (16,84 g). La larve femelle a besoin d'ingérer 81 g de matière sèche pour la production d'1 g d'œuf, ce qui équivaut à 36 g de digesta (Tableau IV).

DISCUSSION

Antheraea mylitta, comme d'autres insectes lépidoptères est très spécialisé pour qu'il ait une croissance rapide qui se réalise principalement par un taux plus élevé d'acquisition de nourriture. Le comportement alimentaire est adapté pour maximiser le taux auquel la nourriture est absorbée par l'intestin, ce qui permet donc un taux maximum de croissance (Reynold et coll., 1985), bien que cela diminue l'efficacité d'utilisation de la nourriture. Dans cette étude, nous avons observé une augmentation remarquable du poids larvaire de 4700 à 5490 fois pendant toute la durée larvaire suite à une augmentation de l'acquisition de nourriture de 319 à 383 fois, qui conduit à une augmentation de la digestion de 159 à 225 fois. Par contre, *A. mylitta* nourri avec des feuilles de *T. tomentosa* enregistre une augmentation du poids larvaire de 5215 à 6260 fois pendant toute sa durée larvaire grâce à l'augmentation de l'ingestion de 322 à 387 fois, suivie par une augmentation de la digestion de 162 à 254 fois. A chaque âge, le poids des larves nourries sur *T. tomentosa* enregistre une croissance supérieure (en masse sèche) à celle des larves nourries sur *T. arjuna* (observations actuelles) [pendant le 1^{er} âge elle est de 0,004 g, pendant le 2^{ème} de 0,058g, pendant le 3^{ème} de 0,267 g, pendant le 4^{ème} de 0,221 g, pendant le 5^{ème} de 0,075 g (mâle) et de 0,513 g (femelle)] (Rath et coll., 2003 b). Les larves de ver à soie *Antheraea mylitta* présentent une accélération du taux de croissance absolue, qui est le plus élevé (71 à 75 % du gain de biomasse totale) pendant le 5^{ème} âge. Cette croissance absolue reste dissimulée, si l'on ne décrit que le RGR qui baisse continuellement du 1^{er} au 5^{ème} âge, après avoir atteint un sommet pendant le 2^{ème} âge. Pendant la période du développement du 5^{ème} âge (qui est comparativement plus long), la valeur de cet indice présente aussi une tendance au déclin, ce qui sous-entend que les animaux plus gros font relativement moins d'efforts que les plus petits, malgré le maintien d'un taux de croissance absolue élevé, comme le prouvent des études antérieures (Reynolds et coll., 1985 ; Rath et coll., 2003 b). Des proportions plus importantes de nourriture digérée (67 à 74 % du total) sont disponibles pendant le 5^{ème} âge pour une croissance plus importante des tissus et pour répondre au coût métabolique plus élevé pendant la synthèse des protéines de la soie et la production d'œufs.

Dans cette étude, le taux de consommation de matière sèche (RCR) baisse avec l'avancée du développement larvaire, tandis que l'ECI (sauf pendant le 5^{ème} âge) et l'ECD correspondants augmentent, ce qui est corroboré par les observations précédentes (d'après un résumé, Waldbauer, 1968), ce qui maintient la croissance larvaire. La baisse du RCR pourrait être due à un temps de résidence plus court de la nourriture dans l'intestin des larves plus jeunes (Slansky et Scriber, 1985).

L'ingestion proportionnelle de nourriture pendant les différents âges larvaires révèle qu'environ 95 à 96 % de l'ingestion totale de matière sèche est ingérée pendant les deux derniers âges et environ 99 % pendant les trois derniers âges d'*A. mylitta*. *Bombyx* et *Protocarpus*, tous les deux des lépidoptères se nourrissant de feuilles ingèrent environ 97 % de leur consommation totale pendant les deux derniers âges et environ 99 % pendant les trois derniers âges, ce qui confirme nos résultats (d'après un résumé, Waldbauer, 1968) comme chez *A. mylitta* nourri avec *Terminalia tomentosa* (Rath et coll., 2003b).

La digestibilité approximative baisse avec l'âge chez *A. mylitta* comme chez de nombreux autres insectes (d'après un résumé, Waldbauer, 1968). Par contre, Kasting et McGinnis (1959) ont signalé une AD plus ou moins constante chez *Agrotis* pendant les trois derniers âges de développement. La raison derrière la baisse de l'AD, bien qu'elle ne soit pas claire est attribuée à la croissance très importante des larves. Par ailleurs, la baisse de l'AD avec l'âge chez cet insecte pourrait être due à la consommation d'une proportion plus élevée de fibres non digestibles pendant le dernier âge (5^{ème} âge).

Chez *A. mylitta*, les larves femelles ingèrent 16 % plus que les mâles et digèrent 28 % plus et ont aussi une valeur de % AD significativement plus élevée que les mâles, mais parallèlement la femelle enregistre une valeur ECD plus faible, qui entraîne un taux de croissance plus lent. Les résultats confirment les observations antérieures chez le même insecte avec *T. tomentosa* comme source de nourriture (Rath et coll., 2003b). Par contre, chez *B. mori* on n'a rapporté aucune différence sexuelle pour les valeurs de l'AD, de l'ECI et de l'ECD pendant le développement du 5^{ème} âge (Hiratsuka, 1920 ; Legay, 1958).

A. mylitta retient 40 % et 36 % de la nourriture assimilée chez la larve mûre respectivement chez le mâle et la femelle. Environ, 5,94 % de la nourriture assimilée chez le mâle et 5,47 % chez la femelle sont détournés pour la production de soie et 2,8 % pour la production d'œufs, par comparaison, *B. mori* dépense 20 % pour la production de soie et 12 % pour la production d'œufs. A sa mort, la femelle *A. mylitta* retient 2,14 % et le mâle 1,68 % de nourriture assimilée, tandis que chez *B. mori*, la femelle retient 14 % et le mâle 25 % de la nourriture assimilée au moment de la mort. *A. mylitta* utilise 89-92 % de la nourriture assimilée pour la respiration, la mue, les transformations larve – nymphe et nymphe – adulte, ce qui est comparable aux dépenses totales de 90 à 91 % chez le même insecte nourri sur *T. tomentosa* (Rath et coll., 2003b), par comparaison seulement 52 % sont dépensés chez *B. mori* (Hiratsuka, 1920), ce qui pourrait être attribué à la nature sauvage d'*A. mylitta*, qui est comparativement moins efficace pour convertir la nourriture assimilée en croissance et en production de soie et d'œufs.

INDUCTION OF TOLERANCE TO ROOT ROT DISEASE IN INDIAN MULBERRY VARIETIES THROUGH *IN VITRO* APPROACHES

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

M. MUTHUSWAMI, S. SUBRAMANIAN*, R. GANGADHARA, M. BHARATHI & R. GNANAM

Root rot disease caused by *Macrophomina phaseolina* has been inflicting serious economic damage in mulberry gardens in India especially in the southern state of Tamil Nadu in the recent years. Studies have been conducted for screening tolerant mulberry varieties through selection for insensitivity of shootlets to pathotoxin, Phaseolinone under *in vitro* conditions. Micropropagation protocols have been standardized for screening the mulberry genotypes through incorporation of phaseolinone at different concentrations along with a combination of growth regulators in MS medium for four Indian mulberry varieties viz., S.708, S.36, V.1 and MR.2. Micropropagation parameters like sprouting per cent, shoot length, root length and number of nodes were not adversely affected in all the varieties tested when toxin concentrations were up to 4.0 per cent. Based on the growth and development parameters viz., bud sprouting, shoot length, root length and survival of shoots in hardening media it was found that the mulberry varieties MR.2 and S.708 were superior to V.1 and S.36. Details of toxin isolation and induction of tolerance to plantlets under *in vitro* conditions have been discussed.

Keywords: Mulberry varieties, root rot, *Macrophomina phaseolina*, induction of tolerance.

INTRODUCTION

Mulberry is affected by many fungal, bacterial, viral and mycoplasma diseases. Soil borne diseases like root rot at times cause the most serious damage, leading to the death of entire plant. Many fungal pathogens are reported to be associated with root rot disease on mulberry. Dry root rot is caused by *Macrophomina phaseolina* (Butler and Bisby, 1960), *Botrydiploidea theobromae* (Sharma *et al* (2003); violet root rot by *Helicobasidium mompa* (Ito, 1941); white root rot by *Rosellina necatrix*. Gupta *et al* (1997) gave an account on occurrence of seedling rot in mulberry. A detailed account on soil borne diseases of mulberry and their management was reviewed by Sharma *et al*. (2003). Although, many chemical fungicides were reported to be in use for the control of root rot disease, repeated applications were needed for effective control of the disease (Tommy Phillip, *et al.*, 1994). Eco-friendly approaches for managing root rot in mulberry using antagonistic microbes were elaborated by Chowdary *et al.* (2009) and Sharma *et al.* (2008 & 2009). As repeated use of chemical fungicides upset the biological equilibrium in soil (Singh, 1984), developing resistant mulberry varieties would be a viable option for sustainable management of the disease.

Tissue culture work on mulberry was done for the first time by Ohyama (1970). Paramjit Khurana (2001) utilized the *in vitro* regeneration protocols for *Agrobacterium* mediated co-cultivation and direct gene delivery in mulberry by particle bombardment.

Since mulberry is having high degree of genetic variability (due to the evolution of intra specific and inter specific varieties), resistance cannot be imparted as a single trait to the existing cultivars. *In*

* entosubra@yahoo.co.in

vitro selection may represent an immediate and inexpensive way of increasing the resistance level of susceptible cultivars or high yielding varieties of mulberry.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of explants:

The explants (shoot tip and nodal segments from different positions) of the four varieties of mulberry viz., S.708, S.36, MR.2 and V.1 were used for the *in vitro* propagation studies.

The explants were washed in running tap water, followed by washing with Tween 20 emulsifier (2-3 drops in 100 ml distilled water). Then, they were washed with distilled water for 2-3 times. The explants were surface sterilized by ethyl alcohol (70%) for 25 seconds and were rinsed with 0.1 per cent mercuric chloride for 5 minutes. The treated explants were then washed for four to five times with sterile distilled water to make them free from sterilants. Then, the explants were kept in a closed flask for further inoculation.

Inoculation of the explants:

The tools were sterilized in the glass bead sterilizer cooled off and used for inoculation. The nodal segments after sterilization were placed in Petri dishes and then the two exposed portions of the nodal segments were cut before inoculation. Also, the scale leaves covering the buds were removed by using the scalpel and forceps. Then, the nodal explants with 2 cm tissue from 3rd or 4th position node of the plant were inoculated in the medium.

Micropropagation:

The nutrient media used in the present study with certain modifications were MS medium (Murashige and Skoog, 1962), Half strength of MS medium, Modified MS medium with B5 vitamins and LS medium (Linsmaier and Skoog, 1965).

Isolation of toxin:

Phaseolinone toxin was isolated from *M. phaseolina* as described by Vidhyasekaran (1997). *M. phaseolina* cultures were grown initially on PDA medium. Then about 4mm disc of mycelium was inoculated into 50 ml of Richard's broth of (pH 7.0) in Erlenmeyer conical flasks (250 ml). After 15 days of growth under stationary condition at room temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), the culture filtrate was obtained by filtration through three layers of cheese cloth. The culture filtrates were concentrated *in vacuo* at 50°C to 10 percent of their volume. An equal volume of methanol was added, and the solution was stored overnight at 5°C . Precipitates were removed by filtration through Whatman No.1 filter paper. The filtrate containing methanol and water after being evaporated to dryness *in vacuo* at 40°C , was dissolved in 10 ml of water. This water preparation was treated with activated charcoal at 3 per cent (w/v), cooled to 4°C , stirred for 12h and filtered through Whatman No.1 filter paper. The filtrate after charcoal treatment was evaporated to dryness and was then dissolved in 10 ml of water. The activated charcoal remaining in the filter paper was washed with 100 ml of methanol and collected in a beaker. The methanol was evaporated *in vacuo* at 40°C .

The water fraction after the removal of activated charcoal by filtration through Whatman No.1 filter paper was partitioned with three volumes of ethyl acetate or petroleum ether using a separating funnel. Both water and solvent fractions were evaporated to dryness *in vacuo* separately. The residues were dissolved in 10 ml of water and the ability of the individual fraction to induce disease symptom was studied as per Vidhyasekaran (1997). Pure toxin isolate was used in the experiments for inducing disease under *in vitro* condition.

Induction of disease resistance:

MS medium was inoculated with different concentrations of *M. phaseolina* toxins viz., 2,4,6,8,10 and 12 per cent. The treatments were given at three different stages viz., inoculation of nodal explants for testing bud sprouting, shoot elongation and rooting stages. The observations on the effect of toxin were recorded 45 days after treatment.

A. Effect of toxin treated media on bud sprouting:

Sterilized nodal explants of the four varieties of mulberry viz., S.708, S.36, MR.2 and V.1 were inoculated in toxic MS media containing different concentrations of toxin (2-12 %) supplemented with growth regulator BAP at 2 mg per litre to evaluate the efficacy of toxin on bud sprouting of nodal explants.

B. Effect of toxin treated media on shoot elongation:

The sprouted shoots of nodal explants obtained from MS media supplemented with BAP (2 mg per liter) were cultured on the toxic shoot elongation media containing different concentrations of toxin (2-12 %) and growth regulators BAP 4 mg and GA₃ 0.5mg per liter for testing the efficacy of toxin on shoot elongation.

C. Effect of toxin treated media on rooting:

The elongated shoots collected from shoot elongation medium were challenged in toxic rooting medium with the different concentrations of toxin in combination with the growth regulators viz., IBA 2.0 mg⁻¹ and NAA 2.0 mg⁻¹ for testing the efficacy of toxin on rooting of mulberry.

Observations on sprouting percentage, shoot length (cm) and root length (cm) were recorded 45 days after treatment.

RESULTS**Effect of toxin on bud sprouting:**

The effect of *M. phaseolina* toxin on bud sprouting was investigated by culturing the nodal explants of the four different varieties on the toxin containing media with the different concentrations (0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 per cent) in the MS medium + BAP 2.0 mg⁻¹. The observations were recorded 45 days after treatment. It was observed that the growth of the explants on the selective medium was slow compared to the control. When the media was incorporated with 2 and 4 per cent of the toxin, there was bud sprouting. Incorporation of toxin beyond 4 per cent inhibited completely the growth of explants. With the increase in concentration of toxin, all the explants turned dark brown and died on the media (Table I).

Effect of toxin on shoot length:

After multiple shoot induction, individual shoots were excised and cultured in the MS media treated with different concentrations of toxin (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 %) + BAP 4 mg⁻¹ + GA₃ 0.5 mg⁻¹ (Table II). Observations were taken 45 days after treatments. The mean shoot elongation was normal (> 5 cm) in the control plants, where all the varieties were on par with each other. When the excised shoots were challenged with 2 per cent of toxin, around 2 cm of shoot length was reduced compared to control. When the concentration of the toxin was increased to 4 per cent, around 3-5 cm of the shoot length was reduced. When the concentration of the toxin was beyond 4 per cent, shoot length was adversely affected. The variety S708 recorded a mean shoot length of 1.33 cm while the other mulberry varieties did not survive at all when the toxin concentration was 60%. With the further increase in the toxin concentration in the media (8, 10, and 12 per cent), entire shoots became brownish and totally died after about 15 to 20 days.

Effect of toxin on rooting:

Elongated shoots were excised and cultured in the toxin containing medium with different levels of toxin (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 per cent) in the Half strength MS medium + IBA 2.0 mg-l + NAA 2.0 mg-l. When observations were recorded on the root length 45 days after treatment, it was observed that the growth of the roots on the selective medium was slow as compared to the control (Table III).

Table I. Effect of toxin on bud sprouting.**Tableau I. Effet des toxines sur le débourrage des bourgeons.**

Sl. No	Treatments	Bud sprouting (%)* Débourrage des bourgeons (%)*				Mean
No. d'ordre	Traitements	Mulberry Accessions Variétés de mûrier				Moyenne
		S 708	MR 2	S 36	V 1	
1	Control / Témoin	9.58 ± 0.226 ^{Aa}	9.24 ± 0.33 ^{Ba}	8.53 ± 0.332 ^{Ca}	8.533 ± 0.244 ^{Da}	8.996 ^a
2	2% (vol/vol) of toxin	7.66 ± 0.333 ^{Ab}	8.00 ± 0.577 ^{Bb}	7.66 ± 0.333 ^{Cb}	7.333 ± 0.333 ^{Db}	7.666 ^b
3	4% (vol/vol) of toxin	4.66 ± 0.333 ^{Ac}	4.33 ± 0.333 ^{Bc}	3.66 ± 0.333 ^{Cc}	3.333 ± 0.333 ^{Dc}	4.000 ^c
4	6% (vol/vol) of toxin	1.33 ± 0.333 ^{Ad}	0.00 ± 0.000 ^{Ac}	0.00 ± 0.000 ^{Ac}	0.000 ± 0.000 ^{Ac}	0.333 ^d
5	8% (vol/vol) of toxin	0.00 ± 0.000 ^{Ad}	0.00 ± 0.000 ^{Ac}	0.00 ± 0.000 ^{Ac}	0.000 ± 0.000 ^{Ac}	0.00 ^d
6	10% (vol/vol) of toxin	0.00 ± 0.000 ^{Ad}	0.00 ± 0.000 ^{Ac}	0.00 ± 0.000 ^{Ac}	0.000 ± 0.000 ^{Ac}	0.000 ^d
7	12% (vol/vol)	0.00 ± 0.000 ^{Ad}	0.00 ± 0.000 ^{Ac}	0.00 ± 0.000 ^{Ac}	0.000 ± 0.000 ^{Ac}	0.000 ^d
	Mean / Moyenne	3.381 ^A	3.190 ^B	3.047 10 ^C	2.952 ^D	

* Mean values of three replications with 10 plants in each replication. / Valeurs moyennes de trois répétitions avec 10 plants dans chaque répétition.

Means in a column followed by common (small) letter/s are not significantly different from each other at 5% level. / Les moyennes dans une colonne suivies par une / des lettres minuscules communes ne sont pas significativement différentes les unes des autres au seuil de 5 %.

Means in a row followed by common (capital) letter/s are not significantly different from each other at 5% level. / Les moyennes dans une rangée suivies par une / des lettre(s) majuscules communes ne sont pas significativement différentes les unes des autres au seuil de 5 %.

Table II. Effect of toxin on shoot elongation.*Tableau II. Effet des toxines sur l'allongement des pousses.*

Sl. No.	Treatments	Shoot length (cm)* Longueur des pousses (cm)*				Mean
No. d'ordre	Traitements	Mulberry Accessions / Variétés de mûrier				Moyenne
		S 708	MR ₂	S 36	V ₁	
1	Control / Témoin	7.66 ± 0.33 ^{Aa}	7.33 ± 0.33 ^{Ba}	7.33 ± 0.33 ^{Ca}	7.33 ± 0.33 ^{Da}	7.416 ^{ac}
2	2% (vol/vol) of toxin	5.33 ± 0.33 ^{Ab}	4.66 ± 0.33 ^{Bb}	3.66 ± 0.33 ^{Cs}	3.66 ± 0.33 ^{Db}	4.333 ^b
3	4% (vol/vol) of toxin	1.33 ± 0.33 ^{Ac}	4.00 ± 0.57 ^{Bc}	2.33 ± 0.33 ^{Cc}	2.00 ± 0.57 ^{Dc}	2.916 ^c
4	6% (vol/vol) of toxin	1.33 ± 0.33 ^{Ad}	0.00 ^c ± 0.00 ^A	0.00 ± 0.33 ^{Cd}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.333 ^d
5	8% (vol/vol) of toxin	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ^{Ac} ± 0.00 ^{Ac}	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.000 ^d
6	10% (vol/vol) of toxin	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ^{Ac} ± 0.00 ^{Ac}	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.000 ^d
7	12% (vol/vol) of toxin	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ^{Ac} ± 0.00 ^{Ac}	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.000 ^d
	Mean / Moyenne	2.523 ^A	2.28 ^B	1.904 ^C	1.857 ^D	

* Mean values of three replications with 10 plants in each replication. / Valeurs moyennes de trois répétitions avec 10 plants dans chaque répétition.

Means in a column followed by common (small) letter/s are not significantly different from each other at 5% level. / Les moyennes dans une colonne suivies par une / des lettres minuscules communes ne sont pas significativement différentes les unes des autres au seuil de 5 %.

Means in a row followed by common (capital) letter/s are not significantly different from each other at 5% level. / Les moyennes dans une rangée suivies par une / des lettre(s) majuscules communes ne sont pas significativement différentes les unes des autres au seuil de 5 %.

The root length was 5.27 cm in S 708, 4.37 cm in MR₂, 3.50 cm in S 36 and 3.30 cm in V₁ in the untreated control. When elongated shoots were challenged with 2 per cent of toxin, the root growth was inhibited by about 1-2 cm compared to the control. When the concentration of the toxin was increased up to 4 per cent, the root length was inhibited by about 2-3 cm (2.29, 2.41, 1.40 and 1.40 cm of root length in S 708, MR₂, S 36 and V₁ respectively). When the concentration of the toxin went beyond 4 per cent, the root growth was adversely affected, and only S 708 had 0.75 cm root length (at 6.0% toxin concentration) and the remaining varieties could not survive. A complete reduction in the growth of roots was observed on the media containing 8, 10, and 12 percent of toxin. The explants became brown and died after 2-3 weeks in this media.

Table III. Effect of toxin on rooting.

Tableau III. Effet des toxines sur le racinement.

Sl. No.	Treatments	Root length (cm) / Longueur des racines (cm)				Mean
No. d'ordre	Traitements	Mulberry Accessions / Variétés de mûrier				Moyenne
		S 708	MR 2	S 36	V 1	
1	Control / Témoin	5.27 ± 0.04 ^{Aa}	4.37 ± 0.10 ^{Ba}	3.50 ± 0.13 ^{Cc}	3.30 ± 0.11 ^{Da}	4.126 ^a
2	2% (vol/vol) of toxin	3.65 ± 0.30 ^{Ab}	2.73 ± 0.38 ^{Ba}	2.49 ± 0.37 ^{Cc}	2.66 ± 0.25 ^{Db}	2.891 ^b
3	4% (vol/vol) of toxin	2.29 ± 0.11 ^{Ac}	2.41 ± 0.064 ^{Bb}	1.40 ± 0.29 ^{Cc}	1.40 ± 0.33 ^{Dc}	1.889 ^c
4	6% (vol/vol) of toxin	0.75 ± 0.14 ^{Ad}	0.00 ± 0.00 ^{Ab}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.187 ^d
5	8% (vol/vol) of toxin	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ± 0.00 ^{Ab}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.000 ^d
6	10% (vol/vol) of toxin	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ± 0.00 ^{Ab}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.000 ^d
7	12% (vol/vol) of toxin	0.00 ± 0.00 ^{Ad}	0.00 ± 0.00 ^{Ab}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.00 ± 0.00 ^{Ac}	0.000 ^d
	Mean / Moyenne	1.709 ^A	1.360 ^B	1.056 ^C	1.071 ^D	

* Mean values of three replications with 10 plants in each replication. / Valeurs moyennes de trois répétitions avec 10 plants dans chaque répétition.

Means in a column followed by common (small) letter/s are not significantly different from each other at 5% level. / Les moyennes dans une colonne suivies par une / des lettres minuscules communes ne sont pas significativement différentes les unes des autres au seuil de 5 %.

Means in a row followed by common (capital) letter/s are not significantly different from each other at 5% level. / Les moyennes dans une rangée suivies par une / des lettre(s) majuscules communes ne sont pas significativement différentes les unes des autres au seuil de 5 %.

Hardening of induced plants:

The plants survived on 2 per cent and 4 per cent toxin treatments were transferred to growing media having garden soil alone and with mixture of charcoal powder.

When 2.0 per cent toxin treated shootlets were planted on the hardening media containing garden soil alone, survival of plants was high in S 708 (30 %) and was the least in V1 (14.2 %) while the varieties MR.2 and S.36Shave recorded survival of 22.2 and 16.6 per cent respectively. The plants treated with 4 per cent of toxin showed higher survival in S 708 (22.2) and the least survival (12.5 %) was observed in V.1.

Table IV. Survivability of toxin treated plants in hardening media.

Tableau IV. Capacité de survie des plants traités avec des toxines dans les milieux de durcissement.

Growing media <i>Milieu de croissance</i>	Survival percentage / <i>Pourcentage de survie</i>							
	Mulberry Accessions / <i>Variétés de mûrier</i>							
	S 708		MR 2		S 36		V 1	
	2%	4%	2%	4%	2%	4%	2%	4%
Garden soil <i>Sol de jardin</i>	30	22.2	22.2	16.6	16.6	14.2	14.2	12.5
Garden soil + Charcoal powder <i>Sol de jardin + poudre de charbon</i>	60	55.5	55.5	33.3	33.3	20	20	16.6

Survival of the toxin treated shootlets was improved dramatically when they were transferred to the hardening media containing garden soil and charcoal. The plants treated with 2 per cent of toxin showed higher survival in S 708 (60.0 %) and the least survival (20.0 %) was observed in V.1. The plants treated with 4 per cent of toxin showed higher survival in S 708 (55.5 %) and the least survival (16.6 %) was observed in V.1 (Table IV).

DISCUSSION

The plants treated with toxin survived at two concentrations (2% and 4%) at all the three stages of treatments viz., bud sprouting stage, shoot elongation stage and rooting stage in all the varieties. Survived plants showed disease resistance after selection. The induced plants at 2 and 4 per cent concentration showed less percentage of survival compared to control and in treated plants, the plants selected from 2 per cent survived more compared to 4 per cent toxin treated plants. This may be due to effect of toxin on cell growth which retarded growth of plantlets under *in vitro* conditions.

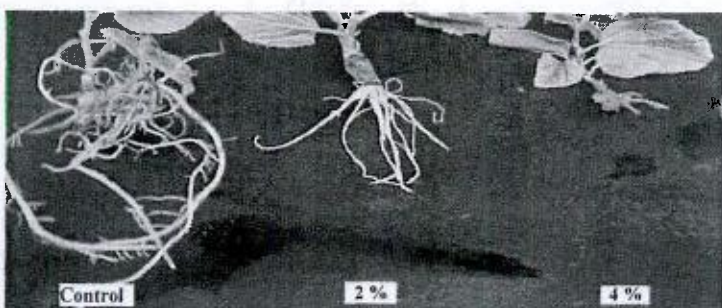
Carlson (1973) demonstrated that plants with increased levels of disease resistance could be obtained by *in vitro* selection. Since then, disease resistance has been generated in a wide range of plant species either by selecting at the cellular level for insensitivity to a pathotoxin or to pathogen inoculation, or by screening for pathogen resistance in unselected regenerants. By using callus and cell cultures of lines challenged with different concentrations (1-15 and 1-20 %) of the culture filtrate of *Fusarium oxysporum*, resistant lines of cucumber and pea were isolated (Ashok kumar *et al.*, 1995). Some sorghum lines showed resistance to charcoal rot caused by *M. phaseolina* at both vegetative or young plant and flowering stage. These lines were tested *in vitro* as well as *in vivo* and were confirmed to possess high degree of resistance to charcoal rot (Rao *et al.*, 2004).



Bud Sprouting Stage



Shoot Elongation Stage

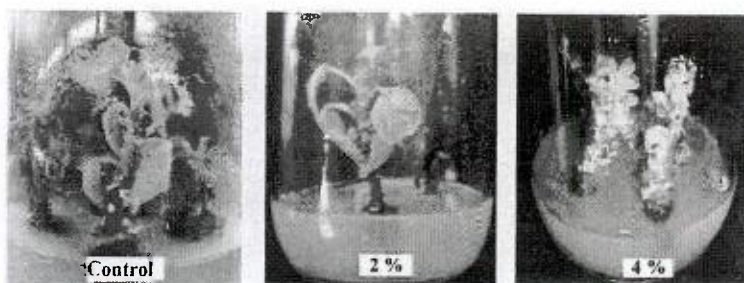


Rooting Stage

Plate 1. Effect of Phaseolinone toxin on mulberry variety MR2.

Planche 1. Effet de la toxine de la phaséolinone sur la variété de mûrier MR2.

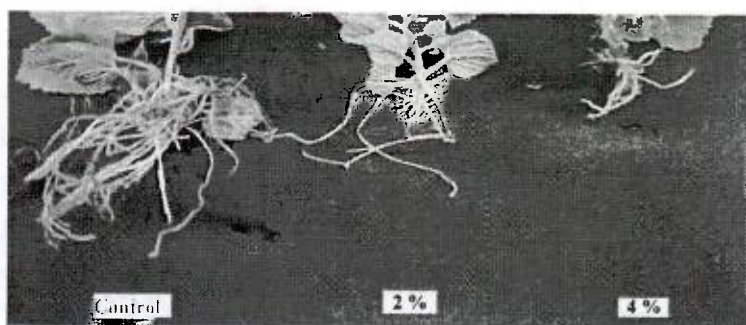
Bud sprouting Stage / Etape de débourrage des bourgeons. Shoot elongation stage / Etape d'allongement des pousses.
Rooting stage / Etape du racinement.



Bud Sprouting stage



Shoot Elongation Stage



Rooting Stage

Plate 2. Effect of Phaseolinone toxin on mulberry variety V1.

Planche 2. Effet de la toxine de la phaséolinone sur la variété de mûrier V1.

Bud sprouting Stage / Etape de débourrage des bourgeons. Shoot elongation stage / Etape d'allongement des pousses.
Rooting stage / Etape du racinement.

There was a significant difference between tolerant (S.708) and moderately susceptible (MR.2) and susceptible varieties (S.36 and V.1) in bud sprouting, shoot elongation and rooting (Plates 1&2). Resistance of mulberry plants infected with phasiolinone toxin may be due to the combination of several factors. Entrapment of the fungi in sac like structures may restrict their movement. Similar observations were made by Huang and Van Dyke (1978) in tobacco cells. The pathogen or its toxin affects membrane systems including that of mitochondria and chloroplast (Hess and Strobel, 1970). Beckman (1990) showed one model of the host responses to the pathogen, relating gel and tyloses formation and lignification as main structural defenses of the infected plants. He also stated that the resistance or susceptibility depends on the quickness of the plant responses to produce these products.

The results reported show that it is possible to select varieties for the decreased sensitivity of the phasiolinone and that this trait has also been expressed by plantlets regenerated from toxin media. Similar successful selection using toxin material called fusaric acid to select resistant material has been reported (Chawla and Wenzel, 1987). In other reports, the use of culture filtrate was proven to be effective (Hartmen *et al.*, 1984; Jin *et al.*, 1996). Nevertheless, the use of a purified toxin represents a more appropriate selective agent since the culture filtrates are known to contain variable number of phytotoxic compounds.

CONCLUSION

It was attempted in the present study to develop a protocol to screen the mulberry genotypes through *in vitro* selection against root rot disease of mulberry caused by *M. phaseolina*. It is evident from the data that the genotype, MR 2 ranked significantly higher than S 36 and V 1 and stood near to the check variety S.708, in terms of sprouting percentage, shoot length and root length. Among the genotypes screened, MR.2 was regarded as a tolerant genotype. The screening techniques employed in the present study offer promising opportunities for improving disease tolerance in high yielding but susceptible mulberry cultivars. Such genotypes can be tested further for disease tolerance in the field condition for developing the new varieties and commercial exploitation.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the authorities of Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore for soliciting sufficient facilities for the conduct of the study.

REFERENCE

- ASHOK KUMAR., SRIVASTAVA, D.K. GUPTA, V.K AND. KOHLI, U.K (1995). Cellular selection and characterization of Pea lines resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum*. Trends in Plant Tissue Culture and Biotechnology : 162-168.
- BECKMAN, C.H. (1990). HOST RESPONSES TO THE PATHOGEN. IN: PLOETZ, R.C. (Ed) Fusarium wilt of banana, pp93-105. APS press. St. Paul. Minnesota.
- BUTLER, E.J. AND BISBY, G.R. (1960). In: VASUDEVA. (Ed.) THE FUNGI OF INDIA. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. p552.
- CARLSON, P.S., (1973). Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. Science, 180: 1366-1368.
- CHAWLA, H.S AND WENZEL, G. (1987). *In vitro* selection for fusaric acid resistant barely plants. Plant breeding 99; 159-163.
- CHOWDARY, N.B. SHRAMA, D.D., MALA, V.R. REDDY, M.P. and KAMBLE, C.R. (2009). Impact of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* in management of pathogen complexity causing root rot disease in mulberry. Sericologia 49(2): 225-231.

- GUPTA, V.P., GOVINDAIAH. and Rajan, H.V. (1997). Diseases and associated pathogens of mulberry nurseries. *Indian Phytopathology* 50: 402-407
- HARTMAN, C.L., MCCOY T.J. AND KNOUS T.R. (1984). Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* *Plant Sci. Lett.* 34: 183-194.
- HESS, W.M. AND STROBEL G.A.. (1970). Ultra structure of potato stems infected with *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathol* 60: 1428-1431
- HUNG, J. AND VANDYKE V.G. (1978). Interaction of tobacco callus tissue with *Pseudomonas talxici* and *P. fluorescens*. *Physiol. Plant Pathol.*, 13 : 65-72.
- ITO, K. (1941). Studies on the Murasaki mompa disease caused by *Helicobasidium mompa* *Bull. Seric. Expt. Stn. (Tokyo).*, 43.
- JIN, H., HARTMAN, G.L HUANG, Y.H. NICKELL C.D. AND WIDHHOLM. J.M. (1996). Regeneration of soybean plants from embryonic suspension cultures treated with toxic culture filtrate of *Fusarium solani* and screening of regenerants for resistance. *Phytopathology*, 86: 714-718.
- LINSMAIER, E.M. AND SKOOG. F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 18: 100-127.
- MURASHIGE, T. AND SKOOG. F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- PARAMJIT KURANA. (2001). Prospects for mulberry improvement by genetic engineering. Abstracts of National Seminar on mulberry sericulture research in India, conducted by Karnataka Sericultural Research and Development Institute, Bangalore, India during 26th -28th November, 2001. pp103.
- OHYAMA, K. (1970). Tissue culture in Mulberry tree. *Journal of Agriculture Research Quarterly*, 21(3): 205-210.
- RAO, S.V., INDIRA, S., ANNAPURNA, A., VISARADA AND BALAKRISHNA, D. (2004). Production and evaluation of tissue culture mutants of sorghum resistant to drought and charcoal rot. *A.P.N.L. Biotechnology Programme*, Institute of Public Enterprise, Osmania University Campus, Hyderabad, India.
- SHARMA, D.D., NAIK, V.N., CHOWDARY, N.B. and MALA, V.R. (2003). Soilborne diseases of mulberry and their management – A review. *Int. indust. Entomol.* 7: 93-106
- SHARMA, D.D., MALA, V.R., DAS, P.K. and DANDIN, S.B (2008) . Effect of compost enrichment with useful/antagonistic microbes on suppression of nursery diseases of mulberry. *Sericologia* 48(1): 109-113.
- SHARMA, D.D., NAIK, V.N., CHOWDARY, N.B. and MALA, V.R. (2003). Soilborne diseases of mulberry and their management – A review. *Int. indust. Entomol.* 7: 93-106
- SHARMA, D.D., NISHITHA NAIK, V., CHOWDARY, N.B., MALA, V.R. and KAMBLE, C.K. (2009). Management of mulberry diseases through eco-friendly approaches – A review. *Sericologia* 49(2): 139-151.
- SINGH, R.S. (1984). Introduction to principles of plant pathology. Oxford and IBH Publishings Co. Pvt. Ltd., New Delhi. 534.
- TOMMY PHILIP, GOVINDAIAH, BAJPAI, A.K. AND DATTA. R.K. (1994). Chemical control of mulberry diseases in India – A review. *Indian J. Seric.*, 33(1): 1-5.
- VIDHYASEKARAN, P. (1997). Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. Marcel Dekker, New York, USA. p 553.

INDUCTION DE LA TOLERANCE A LA MALADIE DE LA POURRITURE DE LA RACINE CHEZ DES VARIETES DE MURIER INDIENNES PAR DES APPROCHES *IN VITRO*

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

**M. MUTHUSWAMI, S. SUBRAMANIAN*, R. GANGADHARA, M. BHARATHI
& R. GNANAM**

Récemment, la maladie de la pourriture de la racine provoquée par *Macrophomina phaseolina* a entraîné des dommages économiques considérables pour les mûraies en Inde surtout dans l'état du Tamil Nadu. Des études ont été réalisées pour évaluer des variétés de mûrier tolérantes par la sélection de rameaux insensibles à la pathotoxine de la phaseolinone dans des conditions *in vitro*. Des protocoles de micro-multiplication ont été standardisés pour évaluer les génotypes de mûrier par l'incorporation de phaseolinone à différentes concentrations avec une combinaison de régulateurs de croissance dans le milieu MS chez quatre variétés de mûrier indiennes, c'est-à-dire S708, S36, V1 et MR2. Les paramètres de micro-multiplication comme le pourcentage de bourgeonnement, la longueur de la pousse, la longueur de la racine et le nombre de nœuds ne sont pas affectés chez toutes les variétés testées quand les concentrations de la toxine atteignent jusqu'à 4 %. D'après les paramètres de croissance et de développement, c'est-à-dire le débourrage des bourgeons, la longueur des pousses, la longueur des racines et la survie des pousses dans les milieux de durcissement, il s'avère que les variétés de mûrier MR2 et S708 sont supérieures à V1 et S36. Nous présentons les caractéristiques d'isolement de la toxine et d'induction de la tolérance des plants dans des conditions *in vitro*.

INTRODUCTION

Le mûrier est atteint par de nombreuses maladies fongiques, bactériennes et des mycoplasmes. Les maladies véhiculées par le sol comme la pourriture de la racine entraînent parfois des dégâts très importants, qui entraînent la mort de l'ensemble de la plante. On a rapporté que de nombreux pathogènes fongiques sont associés à la maladie de la pourriture de la racine chez le mûrier. La pourriture sèche de la racine est causée par *Macrophomina phaseolina* (Butler et Bisby, 1960), *Botrydiploidea theobromae* (Sharma et coll (2003) ; la pourriture violette de la racine par *Helicobasidium mompa* (Ito, 1941) ; la pourriture de la racine blanche par *Rosellina necatrix*. Gupta et coll., (1997) ont publié un rapport sur l'existence de la pourriture des plantules chez le mûrier. Sharma et coll., (2003) ont passé en revue de manière détaillée les maladies véhiculées par le sol chez le mûrier et la manière de lutter contre elles. Bien qu'on ait rapporté que de nombreux fongicides chimiques soient utilisés pour lutter contre la maladie de la pourriture de la racine, il faut des applications répétées pour lutter efficacement contre la maladie (Tommy Phillip et coll., 1994). Des approches respectueuses de l'environnement pour lutter contre la pourriture de la racine chez le mûrier ont été mises au point par Chowdary et coll., (2009) et Sharma et coll., (2008 et 2009) en utilisant des microbes antagonistes. Comme l'utilisation répétée de fongicides chimiques dérange l'équilibre biologique dans le sol (Singh, 1984), la mise au point de variétés résistantes serait une option viable pour lutter durablement contre la maladie.

* entosubra@yahoo.co.in

Le travail sur la culture des tissus chez le mûrier a été réalisé pour la première fois par Ohyama (1970). Paramjit Khurana (2001) a utilisé des protocoles de régénération *in vitro* par la co-culture au moyen d'*Agrobacterium* et la délivrance directe des gènes chez le mûrier par le bombardement de particules.

Puisque le mûrier a un degré important de variabilité génétique (en raison de la mise au point de variétés intraspécifiques et interspécifiques), on ne peut pas attribuer la résistance aux cultivars qui existent comme caractère unique. La sélection *in vitro* pourrait représenter un moyen immédiat et bon marché d'augmenter le niveau de résistance des cultivars sensibles ou des variétés de mûrier à rendement élevé.

MATERIELS ET METHODES

Préparation des explants :

On utilise des explants (extrémités de pousses et segments nodaux à des positions différentes) des quatre variétés de mûrier, c'est-à-dire S 708, S36, MR2 et V1 pour les études de multiplication *in vitro*.

On lave les explants sous l'eau du robinet puis avec l'émulsifiant Tween 20 (2 à 3 gouttes dans 100 ml d'eau distillée). Ensuite, on les lave 2 ou 3 fois avec de l'eau distillée. On stérilise la surface des explants avec de l'alcool éthylique (70 %) pendant 25 secondes et on les rince avec du chlorure de mercure à 0,1 % pendant 5 minutes. Puis, on lave les explants traités quatre ou cinq fois avec de l'eau distillée stérile pour les débarrasser des stérilisants. Ensuite, on conserve les explants dans un flacon fermé pour une inoculation ultérieure.

Inoculation des explants :

On stérilise les outils dans un stérilisateur à billes de verre, on les refroidit et on les utilise pour l'inoculation. Après stérilisation, on place les segments nodaux dans des boîtes de Petri, puis on coupe les deux parties exposées des segments nodaux avant l'inoculation. On retire aussi les feuilles écailleuses recouvrant les bourgeons en utilisant un scalpel et une pince. Puis, on inocule dans le milieu les explants nodaux avec 2 cm de tissu à partir du noeud à la 3^{ème} ou 4^{ème} position sur le plant.

Micro-multiplication :

Les milieux nutritifs utilisés dans cette étude avec quelques modifications sont du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962), du milieu MS à moitié concentré, du milieu MS modifié avec des vitamines B5 et du milieu LS (Linsmaier et Skoog, 1965).

Isolement de la toxine :

On isole la toxine de la phaséolinone de *M. phaseolina* d'après la description de Vidhyasekaran (1997). Au départ, on cultive les cultures de *M. phaseolina* sur du milieu PDA. Puis, on inocule un disque de mycélium d'environ 4 mm dans 50 ml de bouillon de Richard (pH 7,0) dans des fioles Erlenmeyer coniques (250 ml). Au bout de 15 jours de croissance dans des conditions stationnaires à température ambiante ($28 \pm 2^\circ \text{C}$), on obtient le filtrat de culture par filtration dans trois couches de tissu de mousseline. On concentre les filtrats de culture *in vacuo* à 50°C à 10 % de leur volume. On ajoute un volume égal de méthanol, et on stocke la solution pendant la nuit à 5°C . On retire les précipités en les filtrant au travers d'un filtre en papier Whatman No.1. Après avoir évaporé le filtrat contenant le méthanol et l'eau jusqu'au dessèchement *in vacuo* à 40°C , on le dissout dans 10 ml d'eau. On traite cette préparation aqueuse avec du charbon activé à 3 % (w/v), on la refroidit à 4°C , on la mélange pendant 12 h et on la filtre à travers un filtre en papier Whatman no. 1. Après le traitement au charbon, on évapore le filtrat jusqu'au dessèchement et on le dissout dans 10 ml d'eau.

On lave le charbon activé restant dans le filtre en papier avec 100 ml de méthanol et on le recueille dans un gobelet. On évapore le méthanol *in vacuo* à 40° C.

Après le retrait du charbon activé par filtration au travers d'un filtre en papier Whatman no. 1, la fraction aqueuse est partagée avec trois volumes d'acétate d'éthyle ou de pétrole en utilisant un entonnoir de séparation. On évapore séparément la fois les fractions d'eau et de solvant jusqu'au dessèchement *in vacuo*. On dissout les résidus dans 10 ml d'eau et on étudie la capacité d'une fraction individuelle à induire le symptôme de la maladie d'après la description de Vidhyasekaran (1997). On utilise un isolat pur de toxine dans les expériences pour induire la maladie dans des conditions *in vitro*.

Induction de la résistance à la maladie :

On inocule le milieu MS avec différentes concentrations des toxines *M. phaseolina*, c'est-à-dire 2, 4, 6, 8, 10 et 12 %. On procède aux traitements à trois stades différents, c'est-à-dire que les explants nodaux sont inoculés pour tester les stades de débouillage des bourgeons, d'allongement des pousses et de racinement. On enregistre les observations sur l'effet de la toxine 45 jours après le traitement.

A. Effet des milieux traités avec la toxine sur le débouillage des bourgeons :

On inocule les explants nodaux stérilisés des quatre variétés de mûrier, c'est-à-dire S 708, S 36, MR2 et VI dans les milieux MS toxiques contenant les différentes concentrations de la toxine (2 à 12 %), additionnés avec le régulateur de croissance BAP à 2 mg par litre pour évaluer l'efficacité de la toxine sur le débouillage des bourgeons des explants nodaux.

B. Effet des milieux traités avec la toxine sur l'allongement des pousses :

On cultive les pousses des explants nodaux qui ont grandi, obtenues à partir des milieux MS additionnés avec du BAP (2 mg par litre) sur les milieux toxiques d'allongement des pousses contenant les différentes concentrations de la toxine (2 à 12 %) et les régulateurs de croissance BAP (4 mg) et GA3 (0,5 mg par litre) pour tester l'efficacité de la toxine sur l'allongement des pousses.

C. Effet des milieux traités avec la toxine sur le racinement :

Les pousses allongées recueillies sur le milieu d'allongement des pousses sont attaquées dans le milieu de racinement toxique avec les différentes concentrations de la toxine en combinaison avec les régulateurs de croissance, c'est-à-dire de l'IBA à 2,0 mg⁻¹ et du NAA à 2,0 mg⁻¹ et du NAA 2,0 mg⁻¹ pour tester l'efficacité de la toxine sur le racinement du mûrier.

On enregistre les observations sur le pourcentage de racinement, la longueur de la pousse (cm) et la longueur de la racine (cm) 45 jours après le traitement.

RESULTATS

Effet de la toxine sur le débouillage des bourgeons :

On étudie l'effet de la toxine *M. phaseolina* sur le débouillage des bourgeons en cultivant les explants nodaux des quatre différentes variétés sur les milieux contenant la toxine aux différentes concentrations (0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 %) dans le milieu MS BAP 2,0 mg⁻¹. On enregistre les observations 45 jours après le traitement. On observe que la croissance des explants sur le milieu sélectif est lente par comparaison au témoin. Quand on incorpore 2 et 4 % de toxine aux milieux, il se produit un débouillage des bourgeons. Quand on incorpore plus de 4 % de toxine, cela inhibe complètement la croissance des explants. Avec l'augmentation de la concentration de la toxine, tous les explants deviennent marron foncé et meurent sur les milieux (Tableau I).

Effet de la toxine sur la longueur de la pousse :

Après l'induction de pousses multiples, on excise les pousses individuelles et on les cultive dans les milieux MS traités avec les différentes concentrations de toxine (0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 %) + BAP 4 mg^{-1} + GA₃ 0.5 mg^{-1} (Tableau II). On procède aux observations 45 jours après les traitements. L'allongement moyen des pousses est normal ($> 5 \text{ cm}$) chez les plants témoins, où toutes les variétés sont égales entre elles. Quand on attaque les pousses excisées avec 2 % de toxine, on observe une diminution de la longueur de la pousse de 2 cm par comparaison au témoin. Quand on augmente la concentration de la toxine à 4 %, on observe une diminution de la longueur de la pousse d'environ 3 à 5 cm. Quand la concentration de la toxine dépasse 4 %, la longueur de la pousse est affectée. La variété S708 enregistre une longueur moyenne de pousse de 1,33 cm, tandis que les autres variétés de mûrier ne survivent pas quand la concentration de toxine fait 6 %. Avec une augmentation supplémentaire de la concentration de la toxine dans le milieu (8, 10 et 12 %), les pousses entières deviennent marron et meurent complètement au bout de 15 à 20 jours.

Effet de la toxine sur le racinement :

On excise les pousses allongées et on les cultive dans le milieu MS à moitié concentré + IBA $2,0 \text{ mg}^{-1}$ + NAA $2,0 \text{ mg}^{-1}$ contenant les différents niveaux de toxine (0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 %). Quand on enregistre les observations sur la longueur de la racine au bout de 45 jours de traitement, on observe que la croissance des racines sur le milieu sélectif est lente par comparaison au témoin (Tableau III).

La longueur de la racine est de 5,27 cm chez S 708, 4,37 cm chez MR2, 3,50 cm chez S36 et 3,30 cm chez V1 chez les témoins non traités. Quand on attaque les pousses allongées avec 2 % de toxine, la croissance de la racine est inhibée d'environ 1 à 2 cm par comparaison au témoin. Quand la concentration de la toxine augmente jusqu'à 4 %, la longueur de la racine est inhibée d'environ 2 à 3 cm (2,29 ; 2,41 ; 1,40 et 1,40 cm de longueur de racine respectivement chez S708, MR2, S36 et V1). Quand la concentration de la toxine dépasse 4 %, la croissance de la racine est atteinte de manière défavorable et seule S 708 a 0,75 cm de longueur de racine (avec une concentration de toxine à 6 %) et les variétés restantes ne peuvent pas survivre. On observe une diminution complète de la croissance des racines sur les milieux contenant 8, 10 et 12 % de toxine. Les explants deviennent marron et meurent au bout de 2 à 3 semaines dans ces milieux.

Durcissement des plants induits :

Les plants ayant survécu avec des traitements contenant 2 et 4 % de toxine sont transférés dans des milieux de croissance contenant du sol de jardin seul ainsi que du sol de jardin mélangé avec de la poudre de charbon.

Quand on plante les plants traités avec 2 % de toxine dans le milieu de durcissement ne contenant que du sol de jardin, la survie des plants est élevée chez S708 (30 %) et elle est la moins importante chez V1 (14,2 %), tandis que les variétés MR2 et S36 enregistrent une survie de respectivement 22,2 et 16,6 %. Les plants traités avec 4 % de toxine présentent une survie plus élevée chez S 708 (22,2) et on observe la survie la moins importante (12,1 %) chez V1.

La survie des pousses traitées avec la toxine s'améliore considérablement quand on les transfère dans un milieu de durcissement contenant du sol de jardin et du charbon. Les plants traités avec 2 % de toxine présentent une survie plus élevée chez S 708 (60 %) et on observe la survie la moins importante chez V1. Chez les plants traités avec 4 % de toxine, S 708 présente une survie plus élevée (55,5 %) et on observe la survie la moins importante (16,6 %) chez V1 (Tableau IV).

DISCUSSION

Les plants traités avec la toxine survivent avec deux concentrations (2 % et 4 %) pendant les trois stades de traitement, c'est-à-dire les stades de débouillage des bourgeons, d'allongement des pousses

et de racinement chez toutes les variétés. Les plants ayant survécu présentent une résistance à la maladie après la sélection. Les plants induits avec une concentration de 2 et 4 % présentent un pourcentage de survie inférieur par comparaison au témoin et chez les plants traités, les plants sélectionnés traités avec 2 % de toxine survivent mieux que les plants traités à 4 %. Cela pourrait être dû à l'effet de la toxine sur la croissance des cellules, qui retarde la croissance des plants dans des conditions *in vitro*.

Carlson (1973) a montré qu'on peut obtenir des plants avec des niveaux accrus de résistance à la maladie par la sélection *in vitro*. Depuis, on a généré la résistance à la maladie chez un grand ensemble d'espèces de plantes soit en les sélectionnant au niveau cellulaire pour leur insensibilité à l'inoculation d'une pathotoxine ou d'un pathogène, soit en évaluant la résistance au pathogène chez des régénérants non sélectionnés. En utilisant des cultures de cals et de cellules de lignées attaquées avec différentes concentrations (1 à 15 et à 20 %) du filtrat de culture de *Fusarium oxysporum*, on a isolé des lignées résistantes du concombre et du petit pois (Ashok kumar et coll., 1995). Certaines lignées de sorgho présentent une résistance à la pourriture charbonneuse provoquée par *M. phaseolina* à la fois au stade végétatif ou de jeune plant et de floraison. On a testé ces lignées *in vitro* ainsi qu'*in vivo* et il a été confirmé qu'elles possèdent un degré élevé de résistance à la pourriture charbonneuse (Rao et coll., 2004).

Il y a une différence significative entre les variétés tolérantes (S708) et modérément sensibles (MR2) et sensibles (S36 et V1) dans le débouillage des bourgeons, l'allongement des pousses et le racinement (Planches 1 et 2). La résistance des plants de mûrier infestés avec la toxine de la phaséolinone pourrait être due à la combinaison de plusieurs facteurs. Le piégeage des champignons dans des structures comme des sacs pourrait restreindre leurs mouvements. Des observations similaires ont été faites par Huang et Van Dyke (1978) chez les cellules du tabac. Le pathogène ou sa toxine affecte des systèmes membranaires y compris ceux des mitochondries et des chloroplastes (Hess et Strobel, 1970). Beckman (1990) a montré un modèle de réponses de l'hôte au pathogène par la formation de gels, de tyloses et la lignification qui sont les principales défenses structurelles des plants infestés. Il a aussi déclaré que la résistance ou la sensibilité dépend de la vitesse des réponses de la plante à fabriquer ces produits.

Les résultats rapportés montrent qu'il est possible de sélectionner des variétés non sensibles à la phaséolinone et que ce caractère s'exprime aussi chez les plants régénérés à partir de milieux avec de la toxine. On a rapporté une sélection réussie semblable en utilisant une toxine appelée acide fusarique pour sélectionner un matériel résistant (Chawla et Wenzel, 1987). Dans d'autres rapports, l'utilisation de filtrat de culture s'est avérée efficace (Hartmen et coll., 1984 ; Jin et coll., 1996). Néanmoins, l'utilisation de toxine purifiée représente un agent sélectif plus approprié, puisqu'on sait que les filtrats de culture contiennent un nombre variable de composés phytotoxiques.

CONCLUSION

Dans cette étude, on a essayé de mettre au point un protocole pour évaluer les génotypes du mûrier par une sélection *in vitro* contre la maladie de la pourriture de la racine provoquée par *M. phaseolina*. Il est évident d'après les données que le génotype MR2 se classe significativement mieux que S 36 et V1 et est proche de la variété témoin S708, en termes de pourcentage de bourgeonnement, de longueur des pousses et de longueur des racines. Parmi les génotypes évalués, MR2 est considéré comme un génotype tolérant. Les techniques d'évaluation employées dans cette étude offrent des perspectives prometteuses pour améliorer la tolérance aux maladies chez les cultivars de mûrier à rendement élevé mais sensibles. On peut tester plus amplement la tolérance de génotypes de ce type aux maladies dans des conditions de terrain dans le but de mettre au point de nouvelles variétés pour leur exploitation commerciale.

AGE-SPECIFIC FERTILITY LIFE TABLES OF *METEORUS SPILOSOMAE* NARENDRAN AND REMA (HYMENOPTERA: BRACONIDAE), A NEW PARASITOID OF *SPILOSOMA OBLIQUA* WALKER (LEPIDOPTERA: ARCTIIDAE) AT DIFFERENT TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY

B. MARIMADAIAH* & M. GEETHA BAI

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bengaluru – 560 062, India.

*Life-table studies of *Meteorus spilosomae*, the most common parasitoid of *Spilosoma obliqua*, a pest of mulberry in Karnataka, were carried out at three different temperatures, i.e. $19 \pm 1^\circ \text{C}$, 65-80% RH; $24 \pm 1^\circ \text{C}$, 70-85% RH and $29 \pm 1^\circ \text{C}$, 65-85% RH and results are discussed.*

The net reproductive rate (R_0) was 19.20 at 19°C , 41.80 at 24°C , 24.00 at 29°C per generation. The innate capacity for increase (r_c), intrinsic rate of increase (r_m) and finite rate of increase (λ) were 0.1382, 0.1395 and 1.149 at 24°C followed by 0.1366, 0.1373 and 1.147 at 29°C and 0.0790, 0.0793 and 1.0820 at 19°C in that order. Gross reproductive rate (m_x) was 49.1 at 24°C , 27.3 at 29°C and 22.95 at 19°C , in that order. The population doubling time (DT) was 8.74 at 19°C , 5.05 at 29°C and 4.97 at 24°C , in that order. The mean duration of generation (T_c) was 37.40 at 19°C , 27.01 at 24°C and 23.25 days at 29°C , that approximated the true generation time (T) of 37.25 days at 19°C , 26.76 days at 24°C and 23.13 days at 29°C .

Keywords: Life-table, *Meteorus spilosomae*, larval endo-parasitoid, *Spilosoma obliqua*.

INTRODUCTION

Spilosoma obliqua, is a sporadic polyphagous pest attacking many crops of agricultural and horticultural importance, besides weeds. *S. obliqua* is a severe pest of mulberry during monsoon and post monsoon periods. *Meteorus spilosomae* sp.n. is a new and important naturally occurring larval, endo-parasitoid of *S. obliqua*, recorded for the first time during this study. Mortality of *S. obliqua* by *M. spilosomae* commenced from the 4th moult on the last day of 5th instar under field conditions. Among the parasitoids recorded on *S. obliqua*, *M. spilosomae* caused heavy mortality of *S. obliqua* caterpillars (Marimadaiah, 2003). Life-cycle and reproductive behaviour of *M. spilosomae* were studied and reported (Marimadaiah and Geetha Bai, 2009). Different species of *Meteorus* parasitoids were reported on *S. obliqua* i.e., *Meteorus arcticiida* by Kumar and Yadav (1987), *Meteorus dichomeridis* by Katiyar *et al.*, 1999 and *Meteorus* sp. By Pal *et al.*, 1999. Life-table study is one of the useful numerical aids in studying population biology (Southwood, 1978). It is a summary statement on the life of a typical individual of a population helping in studying distribution, determination of age and mortality of any organism and from its data the expected life remaining to an individual can be calculated (Price, 1984).

* Corresponding author.

MATERIALS AND METHODS

A freshly emerged male and a female *M. spilosomae* were allowed to mate. The mated female parasitoid was provided with one hundred, 1 to 2 days of *S. obliqua* caterpillars for 24 h, daily till death in a polythene bag and were fed on 50% honey solution. The parasitized caterpillars were reared separately on mulberry leaves till pupation of the parasitoid. The number of female *M. spilosomae* emerged in the next generation from the first day of oviposition till the last day was counted and recorded.

Age-specific life-tables were prepared and the data were statistically analysed (Southwood (1978), Andrewartha and Birch (1954) as follows:

$$R_0 = \sum x l_x m_x$$

$$T_c = \frac{\sum x l_x m_x}{\sum l_x m_x}$$

$$T = \frac{\ln R_0}{r_m}$$

$$r_c = \frac{\ln R_0}{T_c}$$

r_m may be calculated using the formula

$$\sum_x e^{-r_m x l_x m_x} = 1$$

$$\lambda = e^{r_m}$$

$$DT = \frac{\ln 2}{r_m}$$

Where,

x	= pivotal age in days
l_x	= age-specific longevity
m_x	= number of females produced / female
R_0	= net reproductive rate
T_c	= mean length of generation
T	= true generation time
r_m	= intrinsic rate of natural increase
r_c	= capacity for increase
λ	= finite capacity for increase
DT	= doubling time

This study was carried out in the laboratory at three different temperatures and relative humidity conditions i.e., $19 \pm 1^\circ \text{C}$, RH 65-80%, $24 \pm 1^\circ \text{C}$, RH 70-85% and $29 \pm 1^\circ \text{C}$, RH 65-85%.

RESULTS AND DISCUSSION

The data on the age-specific longevity and fecundity of *M. spilosomae* at 19° C, 24° C and 29° C are presented in Tables I, II and III, respectively and life-table statistics are presented in Table IV. Ovipositing females lived for 4 to 9 days (mean = 6.8 days) at 19° C followed by 6-9 days (mean = 6.8 days) at 24° C and 4-8 days (mean = 6.2 days) at 29° C. Egg laying commenced on the day of emergence. Oviposition period was 4-8 days (mean = 6.6 days) at 19° C, 6-8 days (mean = 6.6 days) at 24° C and 4-8 days (mean = 6.2 days) at 29° C. Ovipositing females laid maximum number of eggs on 4th day at 19° C, on the 6th day at 24° C and on 2nd day at 29° C. The net reproductive rate (R_0) was 19.20 at 19° C, 41.80 at 24° C and 24.00 at 29° C per generation. The innate capacity for increase (r_c), intrinsic rate of increase (λ_m) and finite rate of increase (λ) were 0.1382, 0.1395 and 1.149 at 24° C followed by 0.1366, 0.1373 and 1.147 at 29° C and 0.0790, 0.0793 and 1.0820 at 19° C in that order. Gross reproductive rate (m_x) was 49.1 at 24° C, 27.3 at 29° C and 22.95 at 19° C, in that order. The population doubling time (DT) was 8.74 at 19° C, 5.05 at 29° C and 4.97 at 24° C in that order. The mean duration of generation (T_c) was 37.40 at 19° C, 27.01 at 24° C and 23.25 days at 29° C, that approximated the true generation time (T) of 37.25 days at 19° C, 26.76 days at 24° C, 23.13 days at 29° C.

Table I. Age-specific fertility life-table of *Meteorus spilosomae* at 19 ± 1° C, 65-80% RH.

Tableau I. Tableau de vie sur la fertilité spécifique à l'âge chez *Meteorus spilosomae* à 19 ± 1° C et 65-80 % HR.

Pivotal age (days) (x)	Age-specific longevity (l_x)	Age-specific fecundity (m_x)	$l_x m_x$	$\sum l_x m_x$
Age pivot (jours) (x)	Longévité spécifique à l'âge (l_x)	Fécondité spécifique à l'âge (m_x)		
0-33	Immature stages / Stades immatures			
34	1.0	1.0	1.0	34.0
35	1.0	2.6	2.6	91.0
36	1.0	2.0	2.0	72.0
37	1.0	4.6	4.6	170.2
38	0.8	3.75	3.0	114.0
39	0.8	4.5	3.6	140.4
40	0.8	2.5	2.0	80.0
41	0.2	2.0	0.4	16.4
42	0.2	0	0	0
Total	-	22.95	19.2	718.0

Higher values of gross reproductive rate, net reproductive rate, innate capacity for increase, intrinsic rate of natural increase and finite rate of increase and also shorter population doubling time of *M. spilosomae* is observed at 24 ± 1° C and 70-85% RH. These parameters favour sustainable population growth of *M. spilosomae* in mass culturing in the laboratory.

Table II. Age-specific fertility life-table of *Meteorus spilosomae*, at $24 \pm 1^\circ \text{C}$, 70-85% RH.

Tableau II. Tableau de vie de la fertilité spécifique à l'âge chez *Meteorus spilosomae* à $24 \pm 1^\circ \text{C}$ et 70 à 85 % HR.

Pivotal age (days) (x)	Age-specific longevity (l_x)	Age-specific fecundity (m_x)	$l_x m_x$	$\sum l_x m_x$
Age pivot (jours) (x)	Longévité spécifique à l'âge (l_x)	Fécondité spécifique à l'âge (m_x)		
0-23		Immature stages / Stades immatures		
24	1.0	4.8	4.8	115.2
25	1.0	6.4	6.4	160.0
26	1.0	7.6	7.6	197.6
27	1.0	4.2	4.2	113.4
28	1.0	6.4	6.4	179.2
29	1.0	9.2	9.2	266.8
30	0.4	5.5	2.2	66.0
31	0.2	5.0	1.0	31.0
32	0.2	0	0	0
Total	-	49.1	41.8	1129.2

Table III. Age-specific fertility life-table of *Meteorus spilosomae*, at $29 \pm 1^\circ \text{C}$, 65-85 % RH.

Tableau III. Tableau de vie de la fertilité spécifique à l'âge chez *Meteorus spilosomae* à $29 \pm 1^\circ \text{C}$ et 65-85 % HR.

Pivotal age (days) (x)	Age-specific longevity (l_x)	Age-specific fecundity (m_x)	$l_x m_x$	$\sum l_x m_x$
Age pivot (jours) (x)	Longévité spécifique à l'âge (l_x)	Fécondité spécifique à l'âge (m_x)		
0-20		Immature stages / Stades immatures		
21	1.0	0.6	0.6	12.6
22	1.0	9.8	9.8	215.6
23	1.0	4.8	4.8	110.4
24	1.0	3.4	3.4	81.6
25	0.8	4.5	3.6	90.0
26	0.4	2.5	1.0	26.0
27	0.4	1.5	0.6	16.2
28	0.2	0.2	1.0	5.6
Total	-	27.3	24	558

Table IV. Life—table statistics of *Meteorus spilosomae* at different temperatures.Tableau IV. Statistiques de la table de vie de *Meteorus spilosomae* à différentes températures.

Particulars	19 ± 1° C	24 ± 1° C	29 ± 1° C
<i>Données</i>			
Ro	19.20	41.80	24.00
rc	0.0790	0.1382	0.1366
rm	0.0793	0.1395	0.1373
λ	1.082	1.149	1.147
T	37.25	26.76	23.13
T _c	37.40	27.01	23.25
DT	8.74	4.97	5.05
Max. longevity	9 days	9 days	8 days
<i>Longévité maximum</i>	<i>9 jours</i>	<i>9 jours</i>	<i>8 jours</i>
Min. longevity	4 days	6 days	4 days
<i>Longévité minimum</i>	<i>4 jours</i>	<i>6 jours</i>	<i>4 jours</i>
Average longevity	6.8 days	6.8 days	6.2 days
<i>Longévité moyenne</i>	<i>6,8 jours</i>	<i>6,8 jours</i>	<i>6,2 jours</i>

Life-table statistics of some hymenopteran parasitoids have been reported by earlier workers; Sathe (1986) reported life-table statistics of *C. diurnii* Chalikwar and Rao (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of *Exelastis atomosa* Wals. (Lepidoptera: Pterophoridae). Jyothi and Veeranna (1993) studied the life-tables of *D. anthracia*, a pupal parasitoid of *Exorista sorbillans*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Director and Divisional chief of KSSRDI for the facilities and the supporting staff of Entomology Unit for the technical assistance.

REFERENCES

- ANDREWARTH H. G. & BIRCH L. C. (1954) The distribution and abundance of animals. University of Chicago Press, Chicago.
- JYOTHI H. K. VEERANNA G. (1993) Studies on the biology of *Dirhinus anthracia* (Hymenoptera: Chalcididae) a pupal parasitoid of *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae) and its life-table. Recent Adv. Uzifly Res., 143-153. Proc Natl. Sem Uzifly and its control. 16-17 January, 1992.
- KATIYAR R. L. MANJUNATH, D. & DATTA R. K. (1999) Biology and behaviour of *Meteorus dichomeridis* (Wilkinson) (Hymenoptera: Braconidae), a larval endoparasitoid of Bihar hairy caterpillar, *Spilosoma obliqua* (Walker). Natl. Sem. Trop. Seric., 28-30 December, 1999 University of Agricultural Sciences, Bangalore.

- KUMAR N. & YADAV, R. P. (1987) A new record of parasitism of *Meteorus arctiicida* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) on *Spilosoma* (= *Diacrisia*) *obliqua* Walker. Curr. Sci., 56(21): 1122-1123.
- MARIMADAI AH B. (2003) Studies on some natural enemies of *Spilosoma obliqua* Walker (Lepidoptera: Arctiidae) and certain other lepidopteran pests infesting mulberry. Ph. D thesis, University of Bangalore, Bangalore, pp 1-208.
- MARIMADAI AH B. & GEETHA BAI M. (2009) Biometrics and reproductive behaviour of *Meteorus spilosomae* Narendran and Rema, an important parasitoid of *Spilosoma obliqua* Walker (Lepidoptera: Arctiidae), a pest of mulberry. J. boil. Control 23(2): 115 -120.
- PAL B. C., MASUM AHAMED, HAQUE M. A. & QUDDUS A. (1999) Biology and parasitism of *Meteorus* sp. In *Spilarctia obliqua*. Indian J. Ent. 61(3): 205-212.
- PRICE P. W. (1984) Insect Ecology. John Wiley and Sons, New York, pp. 1-607.
- SATHE T. V. (1986) Life tables and intrinsic rate of natural increase of *Cotesia diurnii* Chalikwar and Rao (Hymenoptera: Braconidae) a larval parasitoid of *Exelastis atomosa* Wals. Entomon, 11(4): 281-283.
- SOUTHWOOD T. R. E. (1978) Ecological methods with particular reference to the study of insect populations. FLBS and Chapman and Hall, Cambridge, pp 524.

FERTILITE SPECIFIQUE A L'AGE CHEZ *METEORUS SPILOSOMAE* NARENDRAN ET REMA (HYMENOPTERE : BRACONIDAE), UN NOUVEAU PARASITOÏDE DE *SPILOSOMA OBLIQUA* WALKER (LEPIDOPTERE : ARCTIIDAE) A DIFFERENTES TEMPERATURES ET HUMIDITES RELATIVES

B. MARIMADAIAH* & M. GEETHA BAI

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

*On a entrepris des études de la table de vie de *Meteorus spilosomae*, le parasitoïde le plus courant de *Spilosoma obliqua*, un insecte nuisible du mûrier dans le Karnataka à trois températures différentes, c'est-à-dire $19 \pm 1^\circ \text{C}$, 65 à 80 % d'HR ; $24 \pm 1^\circ \text{C}$, 70 à 85 % d'HR et $29 \pm 1^\circ \text{C}$ et 65 à 85 % d'HR et nous les présentons ici.*

Le taux de reproduction net (R_0) est de 19,20 à 19°C ; de 41,80 à 24°C et de 24 à 29°C . La capacité innée d'augmentation (r_c), le taux intrinsèque d'augmentation (r_m) et le taux fini d'augmentation λ sont de 0,1382 ; 0,1395 et 1,149 à 24°C suivis par 0,1366 ; 0,1373 et 1,147 à 29°C et 0,0790 ; 0,0793 et 1,0820 à 19°C dans cet ordre. Le taux brut de reproduction (μ_x) est de 49,1 à 24°C ; 27,3 à 29°C et de 22,95 à 19°C dans cet ordre. La durée de doublement de la population (DT) est de 8,74 à 19°C ; de 5,05 à 29°C et de 4,97 à 24°C dans cet ordre. La durée moyenne de génération (T_c) est de 37,40 à 19°C ; 27,01 à 24°C et 23,25 jours à 29°C , ce qui est proche de la véritable durée de génération (T) de 37,25 jours à 19°C ; de 26,76 jours à 24°C et de 23,13 jours à 29°C .

INTRODUCTION

Spilosoma obliqua est un insecte nuisible polyphage sporadique qui attaque de nombreuses cultures agricoles et horticoles importantes, en plus des mauvaises herbes. *S. obliqua* est un insecte nuisible sérieux du mûrier pendant la mousson et après la mousson. *Meteorus spilosomae* sp. n. est un nouvel endo-parasitoïde larvaire important de *S. obliqua* présent dans la nature, enregistré pour la première fois dans cette étude. La mortalité de *S. obliqua* par *M. spilosomae* commence à partir de la 4^{ème} mue, le dernier jour du 5^{ème} âge dans des conditions de terrain. Parmi les parasitoïdes enregistrés sur *S. obliqua*, *M. spilosomae* entraîne une mortalité élevée des chenilles *S. obliqua* (Marimadaiah, 2003). Le cycle de vie et le comportement de reproduction de *M. spilosomae* ont été étudiés dans un rapport (Marimadaiah et Geetha Bai, 2009). Différentes espèces de parasitoïdes *Meteorus* ont été rapportées sur *S. obliqua*, c'est-à-dire *Meteorus arcticiida* par Kumar et Yadav (1987), *Meteorus dichomeridis* par Katiyar et coll., 1999 et *Meteorus* sp. par Pal et coll., 1999. L'étude de la table de vie est l'une des aides numériques utiles pour étudier la biologie d'une population (Southwood, 1978). C'est un résumé de la vie d'un individu typique d'une population qui aide à étudier la distribution, à déterminer l'âge et la mortalité de n'importe quel organisme et à partir de ces données, on peut calculer le temps qui reste à vivre à un individu (Price, 1984).

* Auteur auquel adresser la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

On laisse s'accoupler un mâle et une femelle de *M. spilosomae* venant d'émerger. On apporte à ce parasitoïde femelle cent chenilles *S. obliqua* âgées de 1 à 2 jours pendant 24 h, quotidiennement jusqu'à la mort dans un sac en polyéthylène et on les nourrit avec une solution avec du miel à 50 %. On élève séparément les chenilles parasitées sur des feuilles de mûrier jusqu'à la nymphose du parasitoïde. On compte et on enregistre le nombre de femelles *M. spilosoma* qui émergent à la génération suivante, du premier jour de la ponte jusqu'au dernier jour.

On prépare des tables de vie spécifiques à l'âge et on analyse statistiquement les données Southwood (1978), Andrewartha et Birch (1954) comme suit :

$$R_0 = \sum x l_x m_x$$

$$T_c = \frac{\sum x l_x m_x}{\sum l_x m_x}$$

$$T = \frac{\ln R_0}{r_m}$$

$$r_c = \frac{\ln R_0}{T_c}$$

on peut calculer r_m en utilisant la formule

$$\sum_x e^{-r_m x l_x m_x} = 1$$

$$\lambda = e^{r_m}$$

$$DT = \frac{\ln 2}{r_m}$$

où

x	= âge pivot en jours
l_x	= longévité spécifique à l'âge
m_x	= nombre de femelles produites / femelle
R_0	= taux de reproduction net
T_c	= longueur moyenne de la génération
T	= durée véritable d'une génération
r_m	= taux intrinsèque d'augmentation naturelle
r_c	= capacité d'augmentation
λ	= capacité finie d'augmentation
DT	= temps de doublement

On réalise l'étude en laboratoire avec trois différentes conditions de températures et d'humidité relative, c'est-à-dire $19 \pm 1^\circ \text{C}$, HR de 65 à 80 %, $24 \pm 1^\circ \text{C}$; HR 70 à 85 % et $29 \pm 1^\circ \text{C}$, HR 65 à 85 %.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur la longévité et la fécondité de *M. spilosomae* spécifiques à l'âge à 19° C, 24° C et 29° C sont présentées respectivement dans les Tableaux I, II et III et les statistiques de la table de vie sont présentées dans le Tableau IV. Les femelles qui pondent vivent de 4 à 9 jours (moyenne = 6,8 jours) à 19° C, suivies par 6 à 9 jours (moyenne 6,8 jours) à 24° C et 4 à 8 jours (moyenne = 6,2 jours) à 29° C. La ponte des œufs commence le jour de l'émergence. La durée de ponte est de 4 à 8 jours (moyenne = 6,6 jours) à 19° C ; 6 à 8 jours (moyenne = 6,6 jours) à 24° C et 4 à 8 jours (moyenne = 6,2 jours) à 29° C. Les femelles pondent un nombre maximum d'œufs le 4^{ème} jour à 19° C, le 6^{ème} jour à 24° C et le 2^{ème} jour à 29° C. Le taux de reproduction net (R_0) est de 19,20 à 19° C ; de 41,80 à 24° C et de 24 à 29° C par génération. La capacité innée d'augmentation (r_c), le taux intrinsèque d'augmentation (λ_m) et le taux fini d'augmentation (λ) sont de 0,1382 ; 0,1395 et 1,149 à 24° C suivies par 0,1366 ; 0,1373 et 1,147 à 29° C et 0,0790 ; 0,0793 et 1,0820 à 19° C dans cet ordre. Le taux brut de reproduction (m_x) est de 49,1 à 24° C ; de 27,3 à 29° C et de 22,95 à 19° C dans cet ordre. Le temps de doublement de la population (DT) est de 8,74 à 19° C ; de 5,05 à 29° C et de 4,97 à 24° C dans cet ordre. La durée moyenne de génération (T_c) est de 37,40 à 19° C ; de 27,01 à 24° C et de 23,25 jours à 29° C, qui sont proches de la durée véritable de génération (T) de 37,25 jours à 19° C, de 26,76 jours à 24° C et de 23,13 jours à 29° C.

On observe des valeurs plus élevées pour le taux de reproduction brute, le taux de reproduction net, la capacité innée d'augmentation, le taux intrinsèque d'augmentation naturelle et le taux fini d'augmentation et également un temps de doublement de la population de *M. spilosomae* plus court à 24 ± 1° C et 70 à 85 % d'H. R. Ces paramètres favorisent la croissance durable de la population de *M. spilosomae* dans la culture en masse en laboratoire.

Les statistiques de la table de vie de certains parasitoïdes hyménoptères ont déjà été publiées par des chercheurs ; Sathe (1986) a rapporté des statistiques de la table de vie de *C. diurnii*, Chalilkwar et Rao (Hyménoptère : Braconidae), un parasitoïde larvaire d'*Exelastis atomosa* Wals. (Lépidoptère : Pterophoridae). Jyothi et Veerana (1993) ont étudié les tables de vie de *D. anthracis*, un parasitoïde nymphal d'*Exorista sorbillans*.

DAMAGING THRESHOLD LEVEL OF *MACROPHOMINA PHASEOLINA* CAUSING CHARCOAL ROOT ROT DISEASE IN MULBERRY

N. B. CHOWDARY, D. D. SHARMA, MALA V. R. & S. M. H. QADRI

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

Studies were carried out to find out the economic (damaging) threshold level (ETL) of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal root rot in mulberry through different inoculum levels (2.5, 5.0, 10, and 20%) under green house conditions. Potted mulberry plants of V-1 variety each containing 6kg of sterilized soil were treated with different levels of inoculum of *M. phaseolina*. Within a week of inoculation all the plants at inoculum levels of inoculum of 15 and 20% died. Likewise, 29.8 and 42.6% of plant mortality was recorded at inoculum levels of 5.0 and 10% respectively. The growth parameters of plants (plant height, root length, leaf yield / plant, fresh and dry weight of shoot and root) at inoculum levels of 5 and 10% were significantly reduced (26.1-53.3%) over control. However, there was no mortality and reduction in plant growth parameters at inoculum level of 2.5% which was on par with that of control. As the significant reduction in plant growth parameters and mortality of the plants were observed at inoculum level of 5.0%, the ETL for *M. phaseolina* is determined at 5% inoculum level having the initial spore load of 4.6×10^9 / g soil and inoculated plants exhibited reduced leaf size followed by withering of leaves.

Keywords: Mulberry, economic threshold level, *Macrophomina phaseolina*, root rot.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* spp.) is cultivated as a perennial crop for its foliage to rear silkworm (*Bombyx mori* L.). After the introduction of high yielding varieties followed by intensive cultivation practices, of late the crop has become vulnerable to various types of root rot disease i.e., violet (*Helicobasidium mompa* Tanaka), white (*Rosellinia necatrix* Berl. Ex. Prill.), dry root rot [*Fusarium solani* (Mart) Sacc./ *F. oxysporum* Schlecht.], black root rot [*Botryodiplodia theobromae* Pat.] and charcoal root rot [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid]. These rots have become more alarming because of their epidemic nature and propensity to kill the plant (Sharma *et al.*, 2003). Among these, charcoal root rot is most dangerous causing leaf yield loss up to 31.5% besides deteriorating the leaf quality (Marimuthu, 2005; Chowdary, 2006). Though the disease severity is high, there are no reports on disease development and determination of economic threshold level (ETL) in mulberry. Hence, the present study was undertaken to know the damaging / economic threshold level (ETL) of the *M. phaseolina* causing charcoal root rot, as determining ETL is an important step for taking up appropriate Integrated Disease Management (IDM) for soilborne diseases.

MATERIALS AND METHODS

For determining the ETL of *M. phaseolina*, the experiment was conducted with potted mulberry plants (variety V-1). The most virulent purified isolate of *M. phaseolina* designated as AP-03 (Chowdary, 2006) was selected to determine the damaging threshold level on growth parameters of mulberry. The isolate was mass multiplied on split maize sand medium (Monga and Raj, 1994). The

multiplied inoculum having a spore load of 2.9×10^7 / g was mixed with sterilized soil to obtain various levels of inoculum based on the weight of soil (2.5, 5.0, 10.0, 15.0 and 20.0%). The artificially inoculated soil was filled in 25 cm diameter earthen pots (each with 6 kg soil holding capacity) and V-1 saplings of 4 months were planted. Soil without inoculation of *M. phaseolina* served as control. Eighteen replications were maintained for each level of inoculum and control in the green house in Complete Randomized Block Design (CRBD). After mixing the different loads of *M. phaseolina* in the soil, the initial population (pi) and final population (Pf) after 120 days of inoculation were estimated by dilution plate technique (Waksman, 1922) using Potato Dextrose Agar (PDA) medium and expressed as CFU / g soil. Data on plant growth parameters [plant height (cm), length of root (cm), leaf yield / plant, fresh and dry weight of shoot and root (g)], mortality of plant and disease severity (wilting / rotting) were recorded. The multiplication factor was calculated dividing the final (Pf) soil population of pathogen with initial population (Pi). The trial was repeated two times for confirmation of the results.

Statistical analysis:

The data recorded on influence of different inoculum levels of *M. phaseolina* on growth parameter of mulberry and severity of root rot disease was subjected to test of significance (ANOVA) using INDOSTAT statistical software. In addition, post-hoc test i.e., Tukey's Honestly Significantly Different (HSD) test was also done in order to calculate the significant differences among means of the experimental data.

RESULTS

Results presented in Table I reveal that the reduction in plant growth parameters and mortality of plants depend upon the severity of disease, which in turn was directly related to the inoculum load of *M. phaseolina* present in the soil. Therefore, *M. phaseolina* was able to kill all the plants within a week at inoculum levels of 15.0 and 20.0%. The remaining inoculum levels i.e. 5.0 and 10% significantly reduced the plant growth parameters and increased disease severity over the control. However, the reduction of the plant growth parameters and mortality of plants was not observed at inoculum level of 2.5% and was on par with that of the control.

Significantly higher reduction of plant growth parameters was recorded at inoculum level of 10% as compared to 5.0%. At the inoculum level of 10%, the leaf yield, shoot and root length were reduced by 50.0, 48.8 and 33.9%, respectively. The fresh weight of shoot and root was reduced by 50.8 and 35.7% whereas dry weight to an extent of 53.3 and 38.4% respectively over the control. The disease severity was very high in terms of wilting / yellowing of leaves (63.8%) and rotting of roots (60.3%) where 42.6% of plants died. At inoculum level of 5.0%, all the plant growth parameters were reduced (26.1-34.6%) with disease severity of 39.0 to 43.6% and 29.8% mortality of plants. The multiplication rate of *M. phaseolina* was directly correlated with inoculum levels. Higher multiplication rate of *M. phaseolina* (16.2 times more) was recorded at inoculum level of 20% while minimum was seen at 5% (8.5 times).

DISCUSSION

The significant reduction in plant growth parameters and mortality of plants was at 5% inoculum level having the initial spore load of 4.6×10^6 / g soil suggesting the initial damage level, which is the ETL for *M. phaseolina*. At this inoculum level, multiplication rate of *M. phaseolina* increased over the initial population and the plants survived with reduced leaf size followed by wilting / yellowing of leaves.

Table I. Effect of different inoculum levels of *M. phaseolina* on growth parameters of mulberry and severity of root rot disease.

Tableau I. Effet de différents niveaux d'inoculum de *M. phaseolina* sur les paramètres de croissance du mûrier et sur la sévérité de la maladie de la pourriture de la racine.

Pathogen Inoculum (%)	Initial CFU of pathogen / g soil ($\times 10^6$)	Mortality of plants (%)	Length (cm)		Leaf yield / plant (g)	Fresh weight (g)	
			Shoot	Root		Shoot	Root
Inoculum du pathogène (%)	CFU initial du pathogène / g sol ($\times 10^6$)	Mortalité des plants (%)	Longueur (cm)		Rendement foliaire / plant (g)	Poids frais (g)	
			Pousse	Racine		Pousse	Racine
0.0 <i>Témoin</i>	0.0 ^c $\pm$ 0.0	0.0 ^d $\pm$ 0.0	88.0 ^a $\pm$ 0.58	30.3 ^a $\pm$ 0.45	72.6 ^a $\pm$ 0.48	45.6 ^a $\pm$ 0.68	8.3 ^a $\pm$ 0.56
20.0	54.2 ^a $\pm$ 0.51	100 ^a $\pm$ 0.0	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)
15.0.	48.6 ^b $\pm$ 0.42	100 ^a $\pm$ 0.0	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)	0.0 ^c $\pm$ 0.00 (100%)	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)	0.0 ^d $\pm$ 0.0 (100%)
10.0	18.4 ^c $\pm$ 0.38	42.6 ^b $\pm$ 0.52	45.0 ^c $\pm$ 0.56 (48.8%)	20.0 ^b $\pm$ 0.41 (33.9%)	36.3 ^c $\pm$ 0.49 (50.0%)	22.4 ^c $\pm$ 0.55 (50.8%)	5.33 ^c $\pm$ 0.53 (35.7%)
5.0	4.6 ^d $\pm$ 0.44	29.8 ^c $\pm$ 0.53	65.0 ^b $\pm$ 0.64 (26.1%)	22.6 ^b $\pm$ 0.45 (25.4%)	48.9 ^b $\pm$ 0.53 (32.6%)	29.8 ^b $\pm$ 0.49 (34.6%)	6.3 ^b $\pm$ 0.51 (24.0%)
2.5	0.0009 ^c $\pm$ 0.39	0.0 ^d $\pm$ 0.71	86.8 ^a $\pm$ 0.71 (1.3%)	29.9 ^a $\pm$ 0.48 (1.3%)	72.0 ^a $\pm$ 0.54 (0.8%)	45.0 ^a $\pm$ 0.52 (1.3%)	8.0 ^a $\pm$ 0.61 (3.6%)
SEM $\pm$	0.39	0.54	0.52	0.98	0.83	0.95	0.37
CD at 5%	1.10	1.68	1.58	2.09	1.76	2.02	0.79

Table I. (Continued ..).

Tableau I. (Suite...).

Pathogen inoculum	Dry weight (g)			Final CFU of pathogen / g soil ($\times 10^7$)	Foliar infection (%)	Rotting of roots (%)	Multiplication factor (Pf/Pi)
	Leaf	Shoot	Root				
	Poids sec (g)						
	Feuille	Pousse	Racine				
Inoculum du pathogène				CFU final du pathogène / g de sol ($\times 10^7$)	Infestation foliaire (%)	Pourriture des racines (%)	Facteur de multiplication (Pf/Pi)
0.0 (Control) (Témoin)	16.2 ^a ± 0.57	16.3 ^a ± 0.45	2.6 ^a ± 0.48	0.0 ^c ± 0.00	0.0 ^c ± 0.00	0.0 ^c ± 0.00	-
20.0	0.0 ^d ± 0.0 (100 %)	0.0 ^d ± 0.0 (100 %)	0.0 ^d ± 0.0 (100 %)	87.6 ^a ± 0.45	Plants dead Mort des plants	100 ^a ± 0.00	16.2 ^a ± 0.54
15.0	0.0 ^d ± 0.0	0.0 ^d ± 0.0	0.0 ^d ± 0.0	69.8 ^b ± 0.48	Plants dead Mort des plants	100 ^a ± 0.00	14.4 ^b ± 0.49
10.0	9.8 ^c ± 0.41 (39.5%)	7.6 ^c ± 0.51 (53.3%)	1.6 ^c ± 0.44 (38.4%)	18.9 ^c ± 0.52	6.38 ^a ± 0.499	60.3 ^b ± 0.49	10.3 ^c ± 0.47
5.0	11.4 ^b ± 0.48 (29.6%)	10.8 ^b ± 0.52 (33.7%)	1.9 ^b ± 0.45 (26.9%)	3.9 ^d ± 0.43	43.6 ^b ± 0.48	39.0 ^b ± 0.49	8.5 ^d ± 0.46
2.5	15.9 ^a ± 0.49 (1.8%)	15.5 ^a ± 0.45 (4.9%)	2.4 ^a ± 0.52 (7.6%)	0.03 ^c ± 0.45 ($\times 10^3$)	0.0 ^c ± 0.0	0.0 ^c ± 0.0	- 0.00 ^c ± 0.01

Pf = Final population / Population finale ; Pi = Initial population / Population initiale.

Figures in parentheses indicate percent reduction over control / Les chiffres entre parenthèses indiquent le % de diminution par rapport au témoin.

Means in the column, followed by the same letter are not significantly different according to the Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$).

Les moyennes dans une colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test HSD de Tukey ($P \leq 0.05$).

These observations are in conformity with the findings of Mathur and Shekawat (1992) who stated that inoculum densities of pathogens are known to be directly proportional to the disease severity. Further, Naik *et al.*, (2004; 2005) also reported that inoculum density of 6.25% is considered to be the damaging threshold level for root rot pathogens like *B. theobromae* and *F. solani* having a spore load of $2.1-2.6 \times 10^6$ / g in the soil in mulberry gardens. It has been observed that the disease severity of *M. phaseoli* infection in groundnut increased with higher inoculum level in soil and the dry weight of diseased plants was drastically reduced, possibly due to decreased anabolic activities of the plants (Okwulehie, 2004).

Thus, it can be concluded from the present study that inoculum level of 5% (spore load of 4.6×10^6 g / soil) can be the ETL for *M. phaseolina* based on the symptoms of reduction in growth parameters and mortality of plants of mulberry for root rot disease and preventive measures need to be initiated for effective management of the disease.

REFERENCES

- CHOWDARY N. B. (2006) Studies on root rot disease of mulberry (*Morus* spp.) and its management with special reference to the antagonistic microbes. Ph D. Thesis, University of Mysore, Mysore, India.
- MATHUR K. & SHEKAWAT K. S. (1992) Effect of inoculum density on *Acremonium* wilt of pea. Indian J. Mycol. Plant Pathol., 22: 77-78.
- MARIMUTHU T. (2005) Mulberry root rot caused by *Macrophomina phaseolina*. Proc. Brainstorming session on mulberry root rot. August 9th, 2005, Centre for Plant Protection studies. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, pp. 1-5.
- MONGA D. & RAJ S. (1994) Cultural and pathogenic variations in the isolates of *Rhizoctonia* species causing root rot of cotton. Indian Phytopathol., 47: 403-408.
- NAIK V. N., SHARMA D. D., GOVINDAIAH & CHOWDARY N. B. (2004) Occurrence of root knot disease complex in mulberry due to nematode and fungal association. In: Progress of Research on Disease and Pest Management in Sericulture. Govindan R., Ramakrishna Naika and Sannappa, B. (Eds), Seri Scientific Publishers, Bangalore, India, pp. 29-35.
- NAIK V. N., SHARMA D. D., CHOWDARY N. B. & MALA V. R. (2005) Determination of damaging threshold level for *Botryodiplodia theobromae* in mulberry. In: Advances in Tropical Sericulture. Dandin, S. B.: Misra, R. K. Gupta, V. P. and Reddy Y. S. (Eds.), National Academy of Sericultural Sciences, Bangalore, India. pp. 150-152.
- OKWULEHIE I. C. (2004) Studies on *Macrophomina phaseoli* (Mahb.) Ashby growth and some physiological aspect of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plant infected with the fungus. Global J. Pure and Applied Sciences, 10: 23-29.
- SHARMA D. D. NAIK, V. N. CHOWDARY N. B. & MALA V. R. (2003) Soilborne diseases of mulberry and their management – A review. Int. J. Indust. Entomol., 7: 93-106.
- WAKSMAN S. A. (1922) A tentative outline of the plat method for the determination of the number of microorganism in the soil. Soil Sci., 14: 27-28.

NIVEAU SEUIL DES DEGATS CAUSES PAR *MACROPHOMINA PHASEOLINA*, RESPONSABLE DE LA MALADIE DE LA POURRITURE DE LA RACINE CHARBONNEUSE CHEZ LE MURIER

N. B. CHOWDARY, D. D. SHARMA, MALA V. R. & S. M. H. QADRI

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

On a réalisé des études pour trouver le niveau seuil (de dégâts) économiques (ETL) de *Macrophomina phaseolina* responsable de la pourriture charbonneuse de la racine chez le mûrier avec différents niveaux d'inoculum (2,5 ; 5,0 ; 10 et 20 %) dans des conditions de serre. On traite chaque plant de mûrier de la variété V-1 cultivée dans des pots contenant 6 kg de sol stérilisé avec différents niveaux d'inoculum de *M. phaseolina*. En une semaine d'inoculation avec des niveaux d'inoculum de 15 et 20 % tous les plants meurent. De même, on enregistre une mortalité des plants de 29,8 et 42,6 % avec des niveaux d'inoculum respectivement de 5 et 10 %. Les paramètres de croissance des plants (hauteur du plant, longueur des racines, rendement foliaire / plant, poids frais et sec des pousses et des racines) diminuent significativement (26,1 à 53,3 %) par rapport au témoin. Cependant, il n'y a pas de mortalité et de diminution des paramètres de croissance des plants avec un niveau d'inoculum de 2,5 %, qui est à égalité avec le témoin. Alors qu'on observe une diminution significative des paramètres de croissance de la plante et une mortalité avec un niveau d'inoculum de 5 %, on détermine l'ETL pour *M. phaseolina* à un niveau d'inoculum de 5 %, avec un niveau initial de spores de $4,6 \times 10^6$ / g de sol et les plants inoculés présentent une diminution de la taille des feuilles, suivie par le flétrissement des feuilles.

INTRODUCTION

On cultive le mûrier, *Morus* spp. comme culture pérenne pour son feuillage pour élever le ver à soie (*Bombyx mori* L.). Après l'introduction de variétés à rendement élevé et l'utilisation de pratiques de culture intensive, la culture est devenue récemment vulnérable à différents types de maladies de pourriture des racines, c'est-à-dire, à la pourriture violette (*Helicobasidium mompa* Tanaka), à la pourriture blanche (*Rosellinia necatrix* Berl. Ex Prill.) à la pourriture sèche des racines [*Fusarium solani* (Mart) Sacc. / *F. oxysporum* Schlecht.], à la pourriture noire des racines [*Botryodiplodia theobromae* Pat.] et à la pourriture charbonneuse des racines [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid]. Ces pourritures sont devenues plus alarmantes en raison de leur nature épidémique et de leur tendance à tuer la plante (Sharma et coll., 2003). Parmi elles, la pourriture de la racine charbonneuse est très dangereuse et provoque une perte de rendement foliaire jusqu'à 31,5 %, tout en détériorant la qualité de la feuille (Marimuthu, 2005 ; Chowdary, 2006). Bien que la sévérité de la maladie soit élevée, il n'y a pas de rapport sur le développement de la maladie et la détermination du seuil de niveau économique (ETL) chez le mûrier. Nous avons donc entrepris cette étude pour connaître le seuil de dégâts / économique (ETL) de *M. phaseolina*, responsable de la pourriture de la racine charbonneuse, car la détermination de l'ETL est une étape importante pour entreprendre une lutte intégrée appropriée contre les maladies (IDM) pour les maladies véhiculées par le sol.

MATERIELS ET METHODES

Pour déterminer l'ETL de *M. phaseolina*, on a réalisé l'expérience chez des plants de mûrier en pot (variété V-1). On sélectionne l'isolat purifié de *M. phaseolina* le plus virulent désigné AP-03 (Chowdary, 2006) pour déterminer le niveau seuil de dégâts sur les paramètres de croissance du mûrier. On multiplie l'isolat en masse sur un milieu contenant du sable à maïs (Monga et Raj, 1994). On mélange l'inoculum multiplié avec une charge en spores de $2,9 \times 10^7$ / g avec du sol stérilisé pour obtenir différents niveaux d'inoculum d'après le poids du sol (2,5 ; 5,0 ; 10,0 ; 15,0 et 20 %). On remplit des pots en terre de 25 cm de diamètre (dont la contenance est de 6 kg chacun) avec du sol inoculé artificiellement et on plante les jeunes arbres de 4 mois de la variété V-1. Le sol non inoculé avec *M. phaseolina* sert de témoin. On maintient dix huit répétitions pour chaque niveau d'inoculum et le témoin en serre selon une conception aléatoire complète en blocs (CRBD). Après avoir mélangé les différentes charges de *M. phaseolina* dans le sol, on estime la population initiale (pi) et la population finale (pf) au bout de 120 jours d'inoculation, d'après la technique de dilution sur plaque (Waksman, 1922) en utilisant du milieu agar de dextrose de pomme de terre (PDA) et on l'exprime en CFU / g de sol. On enregistre les données sur les paramètres de croissance de la plante [hauteur du plant (cm), longueur des racines (cm), rendement foliaire / plant, poids frais et sec des pousses et des racines (g)], sur la mortalité du plant et sur la sévérité de la maladie (flétrissement / pourrissement). On calcule le facteur de multiplication en divisant la population finale du sol (Pf) par la population initiale (Pi). On répète l'essai deux fois pour confirmer les résultats.

Analyse statistique :

Les données enregistrées sur l'influence de différents niveaux d'inoculum de *M. phaseolina* sur les paramètres de croissance du mûrier et sur la sévérité de la maladie de la pourriture de la racine sont soumises au test de signification (ANOVA) en utilisant un logiciel statistique INDOSTAT. Par ailleurs, on procède au test post-hoc, c'est-à-dire au test de différence significativement honnête de Tukey (HSD) afin de calculer les différences significatives entre les moyennes des données expérimentales.

RESULTATS

Les résultats présentés dans le Tableau I révèlent que la diminution des paramètres de croissance de la plante et la mortalité des plants dépendent de la sévérité de la maladie, qui à son tour est directement liée à la charge d'inoculum de *M. phaseolina* présente dans le sol. *M. phaseolina* est donc capable de tuer tous les plants en une semaine avec des niveaux d'inoculum de 15 et 20 %. Les niveaux d'inoculum restants, c'est-à-dire 5 et 10 % diminuent significativement les paramètres de croissance de la plante et augmentent la sévérité de la maladie par rapport au témoin. Cependant, on n'observe pas de diminution des paramètres de croissance de la plante et de mortalité des plants avec un niveau d'inoculum de 2,5 % et il est égal au témoin.

On enregistre une diminution significativement plus élevée des paramètres de croissance de la plante avec un niveau d'inoculum de 10 %, par comparaison à 5 %. Avec un niveau d'inoculum de 10 %, le rendement foliaire, la longueur des pousses et des racines diminuent de respectivement 50 ; 48,8 et 33,9 %. Le poids frais des pousses et des racines diminue de 50,8 et 35,7 %, tandis que le poids sec de l'ordre de respectivement 53,3 et 38,4 % par rapport au témoin. La sévérité de la maladie est très élevée en termes de flétrissement / de jaunissement des feuilles (63,8 %) et de pourriture des racines (60,3 %) et 42,6 % des plants meurent. Avec un niveau d'inoculum de 5 %, tous les paramètres de croissance de la plante diminuent (26,1 à 34,6 %) avec une sévérité de la maladie de 39 à 43,6 % et une mortalité des plants de 29,8 %. Le taux de multiplication de *M. phaseolina* est directement corrélé avec les niveaux d'inoculum. On enregistre le taux de multiplication de *M. phaseolina* le plus

élevé (16,2 fois plus) avec un niveau d'inoculum de 20 %, tandis qu'on observe le taux minimum à 5 % (8,5 fois).

DISCUSSION

On observe la diminution significative des paramètres de croissance de la plante et la mortalité des plants avec un niveau d'inoculum de 5 %, avec une charge initiale en spores de $4,6 \times 10^6$ / g de sol, ce qui suggère un niveau initial de dégâts, qui est l'ETL pour *M. phaseolina*. Avec ce niveau d'inoculum, le taux de multiplication de *M. phaseolina* augmente par rapport à la population initiale et les plants survivent avec une diminution de la taille de leurs feuilles, suivie par le flétrissement / le jaunissement de leurs feuilles.

Ces observations confirment les résultats de Mathur et Shekawat (1992) qui ont souligné qu'on sait que les densités d'inoculum de pathogènes sont directement proportionnelles à la sévérité de la maladie. Par ailleurs, Naik et coll., (2004 ; 2005) ont aussi signalé que la densité d'inoculum de 6,25 % est considérée comme le niveau seuil de dégâts pour les pathogènes de la pourriture de la racine tels que *B. theobromae* et *F. solani*, avec une charge en spores de 2,1 à $2,6 \times 10^6$ / g de sol dans les muraies. On a observé que la sévérité de l'infestation *M. phaseoli* chez l'arachide augmente avec un niveau d'inoculum plus élevé dans le sol et le poids sec des plants malades diminue radicalement, probablement en raison de la diminution des activités anaboliques des plants (Okwulehie, 2004).

D'après cette étude, on peut donc conclure que le niveau d'inoculum de 5 % (charge en spores de $4,6 \times 10^6$ / g de sol) peut être l'ETL pour *M. phaseolina*, d'après les symptômes de diminution des paramètres de croissance et de mortalité des plants de mûrier pour la maladie de la pourriture de la racine et des mesures préventives doivent être initiées pour une lutte efficace contre la maladie.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

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

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

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

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

- Acknowledgements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

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

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

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

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

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

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

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

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

- Remerciements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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