

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION *EDITORIAL BOARD*

AKAPANTHU S. (Thaïlande / <i>Thailand</i>)	LEGAY J.-M. (France)
BEAULATON J. (France)	LIU S.-X. (Chine / <i>China</i>)
BECK D. (France)	LU H.-S. (Chine / <i>China</i>)
BOSQUET G. (France)	MANO Y. (Japon / <i>Japan</i>)
CROIZIER G. (France)	MAUCHAMP B. (France)
COUBLE P. (France)	PERSOONS C.J. (Pays-Bas / <i>The Netherlands</i>)
DANDIN S.B. (Inde / <i>India</i>)	PRUDHOMME J.-C. (France)
DAS B.C. (Inde / <i>India</i>)	REALI G. (Italie / <i>Italy</i>)
DATTA R.K. (Inde / <i>India</i>)	SHIMURA K. (Japon / <i>Japan</i>)
DOIRA H. (Japon / <i>Japan</i>)	SHIRATA A. (Japon / <i>Japan</i>)
FONSECA T.C. (Brésil / <i>Brazil</i>)	SOMASHEKAR T.H. (Inde / <i>India</i>)
FOURCHE J. (France)	SONWALKAR T.N. (Inde / <i>India</i>)
FREDDI G. (Italie / <i>Italy</i>)	TAKAHASHI R. (Brésil / <i>Brazil</i>)
GOLDSMITH M.R. (USA)	TAZIMA Y. (Japon / <i>Japan</i>)
HORIE Y. (Japon / <i>Japan</i>)	TRENCZEK T. (Rép. tchèque / <i>Czech Republic</i>)
IATROU K. (Canada)	VAGO C. (France)
JOLLY M.S. (Inde / <i>India</i>)	VEY A. (France)
KOBAYASHI M. (Japon / <i>Japan</i>)	XIA J.-G. (Chine / <i>China</i>)
KRISHNASWAMY S. (Inde / <i>India</i>)	YAMASHITA O. (Japon / <i>Japan</i>)
LEA H. Z. (Corée / <i>Korea</i>)	YANAGAWA H. (Japon / <i>Japan</i>)

SOMMAIRE - CONTENTS

Revue / Review

- Micronutrients in mulberry (*Morus alba* Linn.) cultivation - an overview 603**
 Micronutriments dans la culture du mûrier (*Morus alba* Linn.) 619
 K. P. SINGH

Articles scientifiques / Scientific papers

- Features of larval haemolymph proteins in a pentamolting mutant of *Bombyx mori* rescued by the application of a 1,5 - disubstituted imidazole 629**
 Traits caractéristiques des protéines de l'hémolymph larvaire chez un mutant pentamuant de *Bombyx mori* traité par l'application d'un imidazole disubstitué 1,5 637
 Y. KAWAGUCHI, S. AKAGI, Y. BANNO, K. KOGA, E. KUWANO & H. DOIRA

- A new translucent gene 'of' of the silkworm 641**
 Un nouveau gène translucide « of » chez le ver à soie 645
 MENG ZHIQI, YUTAKA BANNO, HIROSHI DOIRA, LIU JING & H. B. WENG

- Studies on the variability in the different morphovariants of ecorace Bhandara of tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. 647**
 Etudes sur la variabilité chez différents types morphologiques de l'écorage Bhandara du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. 655
 G.S. YADAV, B. M. K. SINGH, B. R. R. P. SINHA & S. S. SINHA

- Fractionation of silk proteins (*Bombyx mori*) by precipitation techniques and hydrophobic interaction chromatography 659**
 Fractionnement des protéines de la soie (*Bombyx mori*) par des techniques de précipitation et chromatographie d'interaction hydrophobe 675
 G. FREDDI & G. ALLARA

- Peeling force as an alternative for the determination of cohesion in silk yarn 683**
 La force d'épluchage comme une alternative pour la détermination de la cohésion du fil de soie 691
 R. CHATTOPADHYAY, S. DAS, M. L. GULRAJANI & K. SEN

Rapports techniques / Technical reports

- Effect of testosterone propionate on the larval, cocoon and adult parameters of the bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. 695**
 Effet du propionate de testostérone sur les paramètres larvaires, du cocon et des adultes chez le ver à soie bivoltin, *Bombyx mori* L. 703
 I. I. HUGAR, R. B. NIRWANI & B. B. KALIWAL

- Improved growth of silkworms from effective treatment of mulberry diseases by *Acacia auriculiformis* extract 707**
 Amélioration de la croissance des vers à soie par traitement des maladies du mûrier avec un extrait d'*Acacia auriculiformis* 713
 S. C. DATTA, S. P. SINHABABU & N. C. SUKUL

Population dynamics of <i>Azotobacter</i> and other microbial groups in mulberry plantation	717
Dynamique des populations des <i>Azotobacter</i> et d'autres groupes microbiens dans les plantations de mûriers	723
S. K. GANGWAR & K. THANGAVELU	

Adventitious shoot formation and plant regeneration from callus cultures of mulberry (<i>Morus alba</i> L.)	727
Formation de pousses adventives et régénération de plants à partir de cultures de cals de mûrier (<i>Morus alba</i> L.)	735
K. KATHIRAVAN, A. GANAPATHI & A. SHAJAHAN	

Studies on multibivoltine cocoon cooking. Part I: Effect of stifling, temperature and duration of cooking on water penetration in multibivoltine cocoons	739
Etudes sur la cuisson des cocons poly × bivoltins. Première partie : Effet de l'étouffage, de la température et de la durée de cuisson sur la pénétration d'eau dans les cocons poly × bivoltins	745
G. HARIRAJ, T. H. SOMASHEKAR & B. N. LAKSHMIPATHIAIAH	

Studies on multibivoltine cocoon cooking. Part II: Effect of stifling, temperature and duration of cooking on reeling and quality characteristics	749
Etudes sur la cuisson des cocons poly × bivoltins. Deuxième partie : Effet de l'étouffage, de la température et de la durée de cuisson sur les caractéristiques de dévidage et de qualité	759
G. HARIRAJ, T. H. SOMASHEKAR & B. N. LAKSHMIPATHIAIAH	

Note brève / Brief note

Role of mulberry, <i>Morus alba</i> L., coupled with sulphur in the reclamation of sodic soil	765
Rôle du mûrier, <i>Morus alba</i> L., couplé au soufre dans la régénération du sol sodique	769
P. C. BOSE & S. K. MAJUMDER	

Bibliographie / Bibliography	771
---	------------

Instructions aux auteurs / Information for contributors

MICRONUTRIENTS IN MULBERRY (*MORUS ALBA* LINN.) CULTIVATION - AN OVERVIEW

K. P. SINGH

National Institute of Science Communication, Dr K. S. Krishnan Marg, New Delhi - 110 012.

Keywords: Micronutrients, iron, manganese, boron, copper, zinc, molybdenum, mulberry cultivation.

INTRODUCTION

The importance of Mulberry (*Morus alba* Linn.) as a silk crop is reflected in its large scale cultivation throughout the world. According to the production year 1994-95 at the nine silk exchanges in Karnataka, a total quantity of 1955.862 tonnes of all qualities of raw silk valued at Rs. 17779.124 lakh was transacted as against 1924.039 tonnes valued at Rs. 14036.268 lakh in the corresponding period of the preceding year and registered an increase of 1.7% in quantity and 26.7% in value (Indian Silk, 1995, 34(1), 58).

Micronutrients i.e. iron, manganese, boron, copper, zinc and molybdenum, also called trace elements or minor elements, are as essential as the so-called secondary nutrients or major to plant growth. These are 'minor' in the sense that their deficiency in the soil replenishment to required amounts is usually made with comparatively much smaller amounts. They hold a function in photosynthesis, respiration and as enzymes as catalyst. Therefore, the micronutrients play a vital role in affecting crops and ultimately animal products. However, in recent years, interest in the use of micronutrients has increased on a large scale because of the heavy consumption of fertilisers, intensive cropping and use of high-yielding crop varieties.

The growth and development of silkworm larvae (*Bombyx mori* Linn.) and the physical characteristics of cocoons such as size, shape, weight, etc. are greatly influenced by the nutrient content of mulberry leaves (Krishnaswami *et al.* 1971). Usage of macro and micronutrients has increased the quality and quantity of mulberry leaves and cocoon yield (Roy and Gupta, 1974; Vishwanath, 1979; Singh *et al.*, 1994). However, information regarding micronutrients for plant growth in general and mulberry in particular is meagre (Lokanath and Shivashankar, 1986). In order to meet the ever increasing demand for silk, a knowledge of application of micronutrients with soil pH, soil conditions, deficiency diseases, biosynthesis of chemicals, judicious use as a soil reclamative agent and fertiliser, disease, and pest, weed control etc. is essential. So far, quality and quantity of leaf and cocoon production of mulberry are concerned.

ROLE OF NUTRIENTS WITH RELATION TO SOIL pH

Mulberry can be grown in acidic as well as alkaline soils. Highly acidic and alkaline soils affect the plant growth adversely. Slightly acidic soils having a pH of 6.2-6.8 are ideal for mulberry cultivation. According to Barber (1984), the relationships of soil pH with micronutrients are as follows:-

Iron:

The presence of iron in hydroxide (OH) forms as Fe^{++} and Fe^{+++} in the soil which in turn, depends on pH and pc, a parameter related to redox potential. The calculated Fe^{+++} activity is maintained by iron oxides and soil iron related to pH. Calculation of soil iron is based on a log KO of - 39.3 for the relation $\text{Fe}(\text{OH})_3 (\text{Soil}) \rightleftharpoons \text{Fe}^{+3} + 3\text{OH}$. The activity of Fe^{+3} decreases 1000 fold for each unit with increasing pH.

The exact value of Fe^{+3} activity may change due to the forms of iron present. If the equilibrium is slow, levels of Fe^{+3} activity may be higher.

Manganese:

Manganese as pyrolusite and manganite can be calculated from solubility products relationship. Solution of Mn^{++} is influenced by pH and pc electron activity i.e $\text{pH} + \text{pc} = 16.62$ (Lindsay, 1979). The relation between pH and Mn^{++} in solution with manganite can be calculated from the reaction.

$$\begin{aligned}\text{Log Mn}^{++} &\rightleftharpoons 25.57 - (\text{pc} + \text{pH}) - 2\text{pH} \\ &= 25.57 - 16.62 - 2\text{pH} \\ &= 8.65 - 2\text{pH}\end{aligned}$$

Thus, the calculated activity would decrease from 4.5×10^{-2} mol/L at pH 5.0 to 4.5×10^{-8} mol/L at pH 8.0. Values predicted at pH are much higher than generally found in soil solution. Hence, solubility alone governs Mn^{++} activity in soil solutions. Values calculated at pH 8.0 are much lower than what would be needed in the soil solution to supply manganese to the root.

Boron:

Increasing soil pH reduces the level of available boron in the soil. Scott *et al.* (1975) found that increasing soil pH decreased the apparent diffusion coefficient for soil boron and increased the amount of added boron that was absorbed by the soil. Reduction in boron concentrations in soil with increasing pH apparently results in a decrease in the rate of boron supply to the root. Later, it may result in a higher boron absorption by the soil, with resulted lower soil solution boron levels.

Copper:

As pH increased more copper was absorbed. Organic matter (a peat soil) absorbed copper at much lower pH values than did montmorillonite. Data agree with the concept that organic matter is the copper. Calcium chloride was added to minimise any exchangeable copper absorption.

Zinc:

Soil pH has a strong effect on zinc's absorption. The minimal zinc concentration is in between pH 7.0 - 8.0. Concentration of zinc in solution decreased 30 fold for every unit of pH increase in the pH range from 5.0 - 7.0. The reduction in solution Zn^{++} concentration for the Mardin soil was believed due to absorption on hydrous oxide surfaces. The level of zinc in solution at a specific soil pH depends on the nature of the soil surfaces and the level of zinc in the soil. Where hydrous oxide surfaces are present, the zinc level in solution is usually lower. At high pH levels, if calcium carbonate is present, the solution zinc level will also be lower. At pH values above 7.5, the level of complexed zinc in solution will depend on the solubility of the organic matter, which, in turn, depends on the solubility of the organic matter, which in turn, depends on the presence of calcium and other cations that may suppress its solubility.

Molybdenum:

The molybdenum content of a crop grown in a soil of pH 5.0 will, on the average, double if the soil is limed to pH 6.0 and increase sixfold if the soil is limed to pH 7.0. The amount of labile molybdenum measured by extraction with an anion exchange resin also increases (Bhella and Dawson, 1972). Plant absorption of molybdenum decreases with increased pH. Though this effect is

evidently over shadowed by the increase in molybdenum, levels may increase 10 fold for each unit increase in soil pH. When molybdenum is added to the soil, the amount absorbed decreases as pH increases.

Generally, the availability of iron, manganese, zinc, copper and boron decreases as the soil pH increases from 5.0 - 7.0, while the availability of molybdenum increases as the pH increases.

Availability of micronutrients in relation to soil pH:

The relation between the availability of micronutrients to mulberry and the soil pH is as follows:

Boron - The symptom of boron deficiency is associated with high pH values, and boron uptake by plants is reduced by increasing the soil pH.

Copper - The amount of exchangeable copper decreases as the pH increases.

Iron - Most of the iron deficiencies have been related to high soil pH.

Manganese - Manganese deficiency is largely the result of a high soil pH.

Molybdenum - The availability of molybdenum increases with the soil pH.

Zinc - Zinc is generally more available to plants in acid than in alkaline soils.

[Source: Bose, P.C. (1987), Indian Silk, 25(3), 22-23.]

MICRONUTRIENT DEFICIENCY IN SOILS

Deficiencies of micronutrients in soil have been observed to limit the maximum potential yield and quality of mulberry leaves. And also due to the continuous depletion of micronutrients from the soil by the mulberry, the soils become deficient in trace elements. An idea about the total micronutrient content of Indian soils can be obtained from the following data. Micronutrient content of Indian soils are:

Micronutrient	Total content in Indian soils:
Manganese	300-1000 ppm
Zinc	10-300 ppm
Copper	1-100 ppm
Boron	7-630 ppm
Molybdenum	0.2-5.0 ppm
Chlorine	12-50 ppm
Iron	0.46 - 27.5 per cent

[Source: Kanwar, J.S. (1969), Indian Fmg. 18 (10), 5-8]

Generally, soil conditions with micronutrients are:

Iron:

In calcareous soils available ferrous salts are usually converted into unavailable ferric salts due to alkalinity. In acid soils, iron is usually available but if an excess of soluble phosphate is present, it may be made unavailable. Chelated iron compounds applied to the soil are much more effective than simple inorganic iron compounds in acid soils. Iron toxicity can also occur if soils that are high in iron become strongly acidic.

Manganese:

Manganese is present in the soil in various forms but the reduced manganese ion (Mn^{++}) is the form in which it is largely absorbed. Like iron, manganese may become deficient in oxidising or alkaline soils because it is converted to unavailable forms.

Boron:

It is present in small amounts in most soils but its availability is often extremely low because it is tightly complexed in the structure of the soil. Boron uptake is low from calcium rich soils and liming

tends to reduce its uptake, suggesting that calcium either causes boron to complex or precipitate in the soil or reduces the capacity of roots to absorb it.

Copper:

Copper is almost universally present in small amounts in soils and is continually replenished by the weathering of copper-containing minerals. It is normally present in the exchange complex of soils where it is tightly held but available to plants, so its deficiency in nature is unknown. However, excessive fertilisation with phosphate may reduce the availability of copper by forming insoluble precipitates.

Zinc:

Alkali and saline alkaline soils cause severe zinc deficiency but it is most common in calcareous soils due to low solubility products like complexes and carbonates of zinc. During cold temperatures, zinc availability is restricted and there is severe soil erosion due to the loss of essential nutrients from top soil.

Molybdenum:

Molybdenum is normally present in soil in an oxidised form, namely molybdate ion (MoSO_4) of calcium and other metals. The molybdenum content of soils may rise to 20ppm - 30 ppm or even more. The solubility of this ion increases as the pH rises. Molybdenum deficiencies are therefore most likely to occur in acid soils. In case nitrates are as the soil source of nitrogen and availability of molybdenum is less than adequate amounts, nitrate assimilation is much affected.

Levels of micronutrients for growth of higher plants including mulberry are:

Sl No.	Micronutrients	Concentration (in ppm)
1.	Molybdenum	0.1
2.	Copper	6.0
3.	Zinc	20.0
4.	Boron	20.0
5.	Manganese	50.0
6.	Iron	100.0
7.	Chlorine	100.0

[Source: Bose, P.C. (1987), Indian Silk, 25(3), 22-23]

DEFICIENCY DISEASES

All agricultural crops suffer from the deficiency of minerals and mulberry is not an exception (Rangaswami *et al.*, 1976) but micronutrients deficiency symptoms in mulberry under field conditions are not quite clear. However, characteristics such as yellowing or redness of leaves which appear first at the tips and spread to areas between the leaf vein, especially in the older leaf, which eventually cause the browning of leaves. According to Bose (1987) deficiency symptoms of micronutrients in mulberry leaves are given below:-

Sl. No.	Elements	Deficiency symptoms
1.	Iron	Appearance of chlorosis on the younger leaves and greening of midribs of the leaves.
2.	Manganese	Rugged outline and chlorotic condition of the mulberry leaves, and rotting in between the veins.
3.	Boron	Growth is slowed-down and young tissues may actually disintegrate and cause the plant to crack, blacken or become abnormal in shape.
4.	Zinc	Chlorotic conditions of the mulberry leaves. It also causes scorchy yellow and brown leaf coloration, sometimes with

- | | | |
|----|------------|---|
| | | darkened veins. |
| 5. | Copper | Wilting of the upper tender leaves and dying of leaf tips of mulberry often without change of colour. |
| 6. | Molybdenum | Chlorotic, interveinal mottling of lower leaves, followed by marginal necrosis and leaf may fail to expand. |

BIOSYNTHESIS OF CHEMICALS

Bidwell (1979) in his classical book mentioned that micronutrients play a major role in the synthesis of a variety of biochemicals in plants. Adequate supply of mineral nutrients to plants leads to synthesis of various chemicals which are required to perform various functions in the metabolism and overall growth. Role of micronutrients in biosynthesis of chemicals are :-

Iron:

Iron is a part of the catalytic site of many important oxidation - reduction enzymes and is essential for the formation of chlorophyll. Importance of iron in heme proteins - cytochromes and cytochrome oxidase of electron transport chain is also seen. It is important for oxidising enzymes - catalase and peroxidase- and iron-containing respiratory enzymes. Iron is a component of several non-heme enzymes such as flavo proteins and is extremely important for electron transfer agent, ferredoxin. In addition, iron may be structurally involved in lamellar lipids in the nucleus, chloroplasts, mitochondria and synthesis of membrane proteins.

Manganese:

Manganese is widely involved in catalytic role in enzymes in activating metals in respiration, reactions of nitrogen metabolism and photosynthesis. It is required for the operation of nitrate reductase and metabolism of indole acetic acid. The most important role of manganese in photosynthesis is in the sequence of reactions by which electrons are derived from water and oxygen is liberated. Manganese may also have a structural role in chloroplast which becomes light sensitive in its absence and ultimately lose their structure and disintegrate under extreme shortage. The structure of mitochondria and nuclei does not seem to be affected in the same way, indicating that the role of manganese in chloroplast, unlike that of iron, may be quite specific.

Boron:

Translocation and absorption of sugars are much reduced in the absence of boron, and it has been suggested that sugars may be moved in the form of borate complexes. Radioactive sugars are found to be more readily, taken up through the leaf surface if small amounts of borates are added simultaneously, and the addition of boron increases in translocation of radioactive products of photosynthesis in $^{14}\text{CO}_2$. It is suggested that boron may be involved in many facets of cell differentiation and development.

Copper:

Copper plays exclusively a catalytic role in plants, being a part of important enzymes such as polyphenol oxidase and ascorbic acid oxidase. It is present in chloroplast's plastocyanin, an important member of photosynthetic electron transport system, and may be involved in nitrite reduction.

Zinc:

It is directly involved in the synthesis of indoleacetic acid (IAA), and its deficiency may cause substantial changes in the form and growth habit of some species - producing shortened and stunted plants with poorly developed apical dominance. In addition, zinc is an obligatory activator of some enzymes such as lactic acid, glutamic acid, alcohol and pyrimidine nucleotide dehydrogenesis. Zinc appears to be involved in protein synthesis.

It is involved in various essential metabolic activities like auxin metabolism, protein synthesis, nucleic acid and carbohydrate metabolism. Its inter-relationship with auxin plays a prominent role in regulating the stem elongation and cell enlargement (Subbaswamy *et al.*, 1995).

Molybdenum:

Molybdenum plays an active role in nitrate reduction and nitrogen fixation and its deficiency results in a reduced organic nitrogen content. This may lead to symptoms of nitrogen deficiency which makes the detection of molybdenum deficiency rather difficult. However, molybdenum evidently has other functions because most plants require molybdenum even when grown in the presence of ammonium fertilisers.

SOIL AMELIORATIVES AND FERTILISERS

It is well known that for any increase in leaf yield per unit area of land, the fertility of the soil alone cannot be relied upon and recourse has to be made to the application of fertilisers and manure. The role of micronutrients as fertilisers and their effect on mulberry are as follows.

(i) Addition of micronutrients through fertiliser amendments and manure:

It is seldom realised that inorganic fertilisers and organic manure also supply some micronutrients. The addition will depend upon the source, nature and amount of application of fertilisers. Hundred kg/ha of a fertiliser containing 100 ppm of micronutrient will raise the micronutrient content of the soil by 10 gram only. The micronutrient content of important fertilisers and manure is given in table I.

In case of superphosphate, basic slag and liming materials the sources of the raw material determine the micronutrient content of the material. Thus, wide variations can be expected depending upon the source of the material.

According to Hemingway, the amounts of micronutrients added by 10 tons of FYM are equivalent to 1450 gram of manganese sulphate, 420 gram Borax, 170 gram copper sulphate, 14 gram cobalt sulphate and 14 gram sodium molybdate. Thus, the amount added through FYM is, though higher than fertilisers, not adequate to correct micronutrient deficiency in soil because of the low content of micronutrients and their lower availability. On the other hand, the liming materials and basic slags are richer sources of some micronutrients and their use as soil amendments also has an additional advantage of supplying some micronutrients.

Like fertilisers and manure, irrigation waters particularly saline irrigation waters also contribute to the micronutrient content of soils. The contribution of irrigation waters for chlorides and boron can be substantial and in some cases it can be even toxic.

The usual rates of application of micronutrients to the soil or spray application are given in Table II.

Most of the elements are available in the form of oxides, carbonates, sulphides and silicates which are as sources or carriers, are given in table III.

Composition of some soluble acid salts and basic sulphate salts used for soil and foliar treatments, are given in table IV.

Other micronutrient carriers which are included in the fertiliser control order, are given in table V.

(ii) Effect on mulberry:

Iron:

Iron sulphate contains 19.0 percent iron and is used as a fertiliser in mulberry gardens. The application of foliar spray of iron @ 2.50 kg/ha and 5.0 kg/ha showed a significant improvement in foliage production. The yield/ kg/ha/yr was more in low concentration than high concentration. No. of leaves, no. of branches, leaf area and foliage yield/plant were increased significantly. Qualitatively, moisture percentage, proteins, reducing and non-reducing sugars and carbohydrates have significant

Table I. Micronutrient content of some important fertilisers and manures.**Tableau I. Contenu en micronutriments d'importants engrais et fumiers.**

(parts per million / parties par million)

Fertiliser	Copper	Zinc	Manganese	Boron	Molybdenum
Engrais	Cuivre	Zinc	Manganèse	Bore	Molybdène
Nitrogenous fertilisers / Engrais azotés					
Ammonium sulphate	Tr. upto				
Sulphate d'ammonium	Traces jusqu'à				
	0.50	0.33	70	6.0	0.1
Ammonium nitrate / Nitrate d'ammonium-	—	4.5-6	5.0	—	—
Ammonium chloride / Chlorure d'ammonium	0.3-1.3	—	—	2.7	—
Urea / Urée	0-3.6	0.50	0.50	5.0	0.7-6.2
Calcium ammonium nitrate /	Tr. upto				
Nitrate	Traces jusqu'à				
d'ammonium de calcium	18.0	8.35	10.5	Tr.	—
Sodium nitrate / Nitrate de sodium	0.10	1.0	8.0	255	—
Ammoniacal liquor / Solution ammoniacale	10.0	—	—	—	—
Phosphatic fertilisers / Engrais à base de phosphate					
Superphosphate	26.0	50-165	65-570	9.5	3.3
Triple superphosphate / Superphosphate triple	2-12	53-100	175-245	529	9.1
Ammonium phosphate /	3-4	80	115-220	—	2.2
Phosphate d'ammonium					
Basic slag / Scories de déphosphoration	9.2-56.4	4-59	689.00	33.4	10.0
	9.0-35.0	10-29	280.00	—	—
Rock phosphate / Phosphate de rocher	5.6-9.5	24-137	130-320	19	5.6
Bonemeal / Engrais d'os broyés	270	660	500	715	
Potassic fertilisers / Engrais à base de potassium					
Potassium chloride / Chlorure de potassium	3.0	3.0	8.0	14.0	0.2
Potassium sulphate / Sulphate de potassium	5.6-10.4	2.0	2.2-13.0	4.0	0.2
Wood ashes / Cendres de bois	7,000	—	2,600	32	10.0
Farmyard manure / Fumier de ferme	10	43-257	201	17.4	0.13
Compost	300-600	9.40	1,240	5.8	0.10
Limestone / Calcaire	4-70	3to 13/3 à 13	40.65	15.4	2.20

Source: J. S. Kanwar (1969), Indian Fmg, 18(10), 5-8.

improvement over control. According to Ito and Niminura (1966), Horie *et al.*, (1967), iron is essential for silkworm rearing. From the silkworm nutrition point of view it has been observed that iron has a potentiality to enhance the larval development and cocoon yields. Iron at 5.0 kg/ha had higher cocoon yields.

Manganese:

Manganese sulphate contains 26.0 percent manganese and is usually applied to overcome the deficiency of manganese in mulberry gardens. Vishwanath (1979) and Lokanath and Shivashankar (1986) obtained increased foliage yield with 2.5 kg/ha and 1.25 kg/ha of manganese, respectively through foliar spray. Ray and Gupta (1974) found higher foliage yield in low dose than high dose. Proteins, sugars starch, carbohydrates and crude fibers were better at low dose than high dose but moisture percentage and other mineral contents were higher in high dose. Manganese is essential for silkworm growth acceleration (Ito and Nininura, 1966; Horie et al., 1967). Lokanath et al., (1986) found that manganese has a potentiality to enhance the larval development and cocoon yield. Vishwanath (1979) also reported that larval weight and shell percentage were high in low concentration whereas cocoon yield, pupae weight, single cocoon weight and renditta were high in high dose over the control.

Table II. Usual rates of application of micronutrients to crops.

Tableau II. Taux d'application usuels des micronutriments aux plantes.

Micronutrient	Common materials and rates of application to soil	Spray application
<i>Micronutriment</i>	<i>Produits habituels et taux d'application au sol</i>	<i>Vaporisation</i>
Boron <i>Bore</i>	Borax at the rate of 5-20 kg / ha <i>Boraxe au taux de 5-20 kg /ha</i>	0.2 % borax <i>0,2 pour cent borax</i>
Copper <i>Cuivre</i>	Copper sulphate 10 to 50 kg/ha <i>Sulphate de cuivre 10 à 50 kg/ha</i>	0.1 % copper sulphate + 0.05 % lime <i>0,1% sulphate de cuivre + 0,05% d'oxyde de calcium</i>
Manganese	Manganese sulphate 10-50 kg/ha <i>Sulphate de manganèse 10-50kg/ha</i>	0.6% Mn SO ₄ + 0.3% lime <i>0,6 % MnSO₄+ 0,3 % d'oxyde de calcium</i>
Zinc <i>Zinc</i>	Zinc sulphate, zinc oxide 10-40 kg/ha <i>Sulphate de zinc, oxyde de zinc 10-40 kg/ha</i>	0.5% zinc sulphate + 0.25% lime <i>0,5 % sulphate de zinc + 0,25% d'oxyde de calcium</i>
Molybdenum <i>Molybdène</i>	Sodium molybdate 15-500 gram/ha <i>Molybdate de sodium 15-500 gram/ha</i>	0.05% sodium molybdate <i>0,05% molybdate de sodium</i>
Iron <i>Fer</i>	Ferrous sulphate 10kg/ha <i>Sulphate de fer 10 kg/ha</i>	0.4% ferrous sulphate + 0.2% lime <i>0,4% sulphate de fer + 0,2 % d'oxyde de calcium</i>

Source: Kanwar, J.S. (1969), Indian Fmg., 18(10), 52

Boron:

Borax contains 10.6 percent boron and is used in mulberry gardens. Lokanath and Shivashankar (1986) sprayed boric acid @2.00 kg/ha and 4.00 kg/ha and found that foliage yield was more in low dose whereas high dose produced an adverse effect on the number of branches, leaves and leaf area. Perhaps, 4.00 kg/ha was too high and toxic, while low dose was not able to give full expression but

improve growth/yield characters. From qualitative studies, low dose was more ideal than high dose. Lokanath *et al.* (1986) found that 4.00 kg/ha had high cocoon yields, shell percentage and renditta, the weight of silk per 10 cocoons varied marginally from 1.23 - 1.48 g and that of silkwaste ranges from 0.14 - 0.18 g/10 cocoons. The mean renditta was 7.87. It means that boron enhanced the larval development and cocoon yield.

Copper:

Copper sulphate contains 25.6 percent copper and is used as a fertiliser in mulberry gardens. Generally, it is applied as a foliar spray with a mixture of $\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$. Ray and Gupta (1974) found that foliage yield was more in low concentration over control and high dose. On biochemical studies he found that moisture percentage, minerals, proteins, sugars and total carbohydrate were more at low dose whereas starch content and crude fibers were more in high dose over low dose and control.

Zinc:

Zinc sulphate contains 36.0 percent zinc and is used as a fertiliser to combat the deficiencies in mulberry gardens. Zinc deficiency can be corrected by soil application of commercial zinc sulphate to mulberry garden. Foliar application of pure zinc sulphate solution (0.5 - 1%) is also advocated to

Table III. Analysis and composition of the average ore, the metal content of ores used in the smelting process for the recovery of trace element metals.

Tableau III. Analyse et composition de minerais usuels, du contenu en métal de minerais utilisés dans le processus de fusion pour récupérer les métaux en traces.

Metal	Sulfide	Oxide	Carbonate	Silicate
Métal	Sulfure	Oxyde	Carbonate	Silicate
Copper	Chalocite; Cu_2S 79.8% Cu	Cuprite: red Cu_2O 88% Cu	Azurite; 2CuCO_3 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 55.1% Cu	—
Cuivre	Chalocite; Cu_2S 79.8% Cu	Cuprite: rouge Cu_2O 88% Cu	Azurite $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 55.1% Cu	—
Zinc	Sphalerite; ZnS 67% Zn	Zincite; ZnO 80.3% Zn	Smithsonite; ZnCO_3 -52.1% Zn	Willemite Zn_2SiO_4 58.6%
Manganese	—	Pyrolusite; MnO_2 63.2% Mn	Rhodochrosite; MnCO_3 -47.8% Mn	Rhodonite MnSiO_4 41%
Iron / Fer	Pyrite; FeS_2	Magnetite; Fe_3O_4 72.4% Fe	Siderite; FeCO_3 62.12% FeO	Mn
Boron / Bore	—	Tineal; $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ 10 H_2O -36.5% B_2O_3	—	—
Molybdenum / Molybdène	Molybdenite; MoS_2 -60% Mo	Sulfenite; PbMoO_4 39.3% MoO_3	—	—
Cobalt	Cobaltite; CoAsS 35% Co Linnacite: Co_3S_4 (+ iron & nickel)	—	—	—

standing crops. Commercial zinc sulphate was applied in different doses, along with farmyard manure to zinc deficient mulberry gardens after pruning. Results indicate a significant improvement in leaf yield and considerable reduction in cost when zinc sulphate was added 3 kg/ha and 5 kg/ha per crop (Subbaswamy *et al.*, 1995). Ray and Gupta (1974), and Lokanath and Shivashankar (1986) obtained improvement in yield of mulberry leaves with foliar application. Vishwanath and Krishnamurthy (1982-83) observed that zinc gave maximum intake efficiency of 80.5 percent at 5.0 kg/ha. Earlier studies conducted by Horie *et al.*, (1967) indicated the importance of zinc for a better silk worm growth. Cocoon yield was 386.82 kg/ha by 10 kg/ha zinc spray.

Table IV. Analysis and composition of soluble acid salts and basic sulfate salts used for soil and foliar treatment.

Tableau IV. Analyse et composition des sels acides solubles et des sels de sulfate basiques utilisés dans les traitements du sol et des feuilles.

I. Copper/Cuivre:		
Copper sulfate monohydrate / Monohydrate de sulfate de cuivre— $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		35% Cu
Copper sulfate pentahydrate / Pentahydrate de sulfate de cuivre— $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		25% Cu
Basic copper sulfates / Sulfates de cuivre basiques— $\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$		(a) 13% Cu
(general formula / formule générale)		(a) 13% Cu
		(a) 13% Cu
		(b) 26% Cu
		(c) 34% Cu
		(d) 53% Cu
Basic copper carbonates / Carbonates de cuivre basiques:		
(a) Malachite $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$		57% Cu
(b) Azurite $2\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$		55% Cu
II. Zinc:		
Zinc sulfate monohydrate / Monohydrate de sulfate de zinc— $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		35% Zn
Zinc sulfate heptahydrate / Heptahydrate de sulfate de zinc— $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		23% Zn
Basic zinc sulfates / Sulfates de zinc basiques— $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{Zn}(\text{OH})_2$		55% Zn
III. Manganese:		
Manganese sulfate / Sulfate de manganèse (65%) MnSO_4		23% sol. Mn
Basic manganese sulfate / Sulfate de manganèse basique $2\text{MnSO}_4 \cdot \text{MnO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$		40-49% Mn
IV. Borax / borax:		
Fertilizer grade borate / Borate de niveau engrais $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$		34-44% B_2O_3
V. Iron / Fer:		
Ferrous sulfate / Sulfate de fer— $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		20% sol. Fe
Ferric sulfate / Sulfate de fer— $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		17% sol. Fe
VI. Molybdenum/Molybdène:		
Sodium molybdate— $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		37-39% Mo
VII. Cobalt:		
Cobaltous sulfate / Sulfate cobalte— $\text{CoSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		21-24% Co

Source for table III & IV: Nikitin A. A. (1960): Section A. Production and use of trace salts in fertilisers, in: Chemistry and Technology of fertilisers edited by Vincent Sauchelli, Reinhold Publishing Corp., New York, London

Table V. Micronutrient carriers included in the fertiliser control order.*Tableau V. Porteurs de micronutriments inclus dans les consignes de contrôle des engrais.*

Element	Fertiliser /Engrais	Content Contenu
Boron / Bore	Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	10.5%
Boron / Bore	Solubor ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{B}_{10}\text{O}_{16} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	19.0%
Copper / Cuivre	Copper sulphate / <i>Sulphate de cuivre</i> ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	24.0%
Iron / Fer	Ferrous sulphate / <i>Sulphate de fer</i> ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	19.0%
Iron / Fer	Chelated as FEDTA / <i>Chèlaté comme FeEDTA</i>	12.0%
Manganese	Manganese sulphate / <i>Sulphate de manganèse</i> ($\text{MnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	30.0%
Molybdenum / <i>Molybdène</i>	Ammonium molybdate / <i>Molybdate d'ammonium</i> ($(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	52.0%
Zinc	Zinc sulphate / <i>Sulphate de zinc</i> ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	21.0%
Zinc	Chelated zinc as Zn-EDTA / <i>Chèlaté comme Zn-EDTA</i>	12.0%

Source: Tandon, H.L.S (1989). Secondary and micronutrient recommendations for soils and crops - A guidebook: Fertiliser Development and Consultation Organisation, New Delhi-48, pp.81.

Molybdenum:

Ammonium molybdate contains 54.0 percent molybdenum and is used in mulberry gardens. In some cases, molybdenum waste of the electric lamp industry is used as fertilisers. Ammonium or sodium molybdate is applied as foliar dressing (0.028 - 0.035 kg/ha) or in soil (0.07 - 2.3 kg/ha), though recommended dose for mulberry is yet to be reported. It is also evident that foliar spray of molybdenum on mulberry leaves increases the moisture percentage (2.0%), protein (2.8 - 6.3%) and mineral content (4.0 - 7.0%) and to some extent leaf yield 0.869% over control.

DISEASES AND PESTS

According to Singh (1992) micronutrients in disease control, there is no information available on mulberry disease control either as fungicides, as insecticides except copper fungicides. Only very few details are available regarding 'Tracet', a compound of micronutrients on powdery mildew disease. For further studies some researches are still carried on 'Plantonic', a recently produce compound of micronutrients also shows such type of results. But, for the correction of these mineral deficiency diseases, some compound of micronutrients can be used. Sodium tetraborate - a compound of boron in the form of borax can be applied foliarly. Iron in the form of sulphate as foliar application is found useful for the correction of leaf chlorosis. By the application of chelated iron compounds or ferrous sulphate to the soil also help to control the chlorosis disease. Manganese in sulphate form is usually applied to overcome the deficiency of manganese in a mulberry garden. Sodium molybdate or ammonium molybdate solution is generally used as a foliarly sprayed fertilisers to eliminate the molybdenum deficiency symptoms of mulberry plants. Foliar application of zinc in sulphate form is used to relieve the leaf rosetting of mulberry, a symptom of zinc deficiency (Vishwanath, 1979). The oldest fungicide among copper fungicide is bordeaux mixture. The diseases controlled by copper fungicide in mulberry are given in table VI.

Table VI. Mulberry diseases controlled by copper fungicides.**Tableau VI. Maladies du mûrier maîtrisées par des fongicides à base de cuivre.**

S. No.	Name of diseases	Casual organism	Copper fungicides	Ref.
	Nom des maladies	Organisme ordinaire	Fongicides à base de cuivre	
1	False mildew <i>Faux mildiou</i>	<i>Mycosphaerella mori</i>	Copper fungicides Pirone, 1976 <i>Fongicides à base de cuivre</i>	
2	Leaf spot <i>Cercospora moricola</i> <i>Tache de la feuille</i>	Bordeaux mixture	Kanti, 1976 <i>Bouillie bordelaise</i>	
3	Red rust <i>Aecidium mori</i> <i>Rouille rouge</i>	Bordeaux mixture	Rangaswami <i>et al.</i> , <i>Bouillie bordelaise</i> 1976	
4	Stem canker <i>Chancre de la tige</i>	<i>Botryodiplodia theobromai</i>	Bordeaux mixture Shree, 1984 <i>Bouillie bordelaise</i>	
5	Root rot <i>Rosellinia necatrix</i> <i>Pourrissement des racines</i>	% copper sulphate	Mandal <i>et al.</i> , 1992 <i>Sulfate de cuivre 1 %</i>	
6	White silky stem rot <i>Pourrissement de la tige d'un blanc crayeux</i>	<i>Corticium centrifugum</i>	Bordeaux mix. Anonymous 1980 <i>Bouillie bordelaise</i>	
7	Bud blight cola <i>Flétrissure cola des bourgeons</i>	<i>Gibberella mori cola</i>	do do	
8	Powdery mildew <i>Mildiou poudreux</i>	<i>Phyllactinia moricola</i> <i>Bouillie bordelaise ou solution à base de savon ou de cuivre</i>	Bordeaux mixture. or copper or soap solution do	
9	Any infection on new saplings <i>Infection quelconque sur les nouveaux plants</i>	solution	1% Copper sulphate Rangaswami <i>et al.</i> 1976 <i>Solution de sulfate de cuivre 1 %</i>	

WEED CONTROL

Weeds are a great menace to all agricultural crops and mulberry is not an exception (Das *et al.*, 1971; Vijay and Rizvi, 1977; Ali and Qaiyyum, 1991). They not only compete mulberry for nutrients, moisture, light and space but also serve as alternate and collateral hosts of pathogens (Govindaiah *et al.*, 1989). Srinivasan *et al.* (1987) reported that weed densities of 4, 8, 16 and 32 weeds per m²

WEED CONTROL

Weeds are a great menace to all agricultural crops and mulberry is not an exception (Das *et al.*, 1971; Vijay and Rizvi, 1977; Ali and Qaiyyum, 1991). They not only compete mulberry for nutrients, moisture, light and space but also serve as alternate and collateral hosts of pathogens (Govindaiah *et al.*, 1989). Srinivasan *et al.* (1987) reported that weed densities of 4, 8, 16 and 32 weeds per m² reduced the nutrients status of the mulberry leaf and the resultant loss was of the order of 4,590 to 8,650 kg of moisture, 302 to 571 kg of crude protein, 389.43 to 72.37 kg of reducing sugars and 219.7 to 449.9 kg of total carbohydrates. Crop weed competition in mulberry has been studied for its leaf yield loss (Sikdar *et al.*, 1984).

Manual weeding, though quite effective, is a labour-oriented and time consuming operation. Nowadays, manual power has become dearer day by day and the narrowing margins of daily norms and ever-increasing demand pose problems in the work. It has been suggested to use weedkillers to overcome this menace. These micro nutrients can also be used as weedkillers.

Rademacher (1940) in France and Bolley (1908) in America found that solutions of copper salts applied by mixed stands of broad-leaved weeds in cereals would kill the former and not harm the latter. Gupta and Lamba (1978) mentioned that copper sulphate is the oldest and most widely used algicide the world over. Rates of 0.1-1.0 ppm are used for controlling pond scum, and 1.5-2.0 ppm for Chara. With diquat it is used for controlling Hydrilla. Copper sulphate is ineffective as an algicide in high pH and hard water.

Cook (1937a) found zinc chloride to be highly toxic as a contact spray on four annual weeds, including wild oat. Zinc sulphate was intermediate in toxicity among the 76 chemicals tried.

Boron compounds have found a very important use in chemical weed control. Poly borchlorate and chlorax, which combine boron compounds with sodium chlorate, chlorea, which contains boron compounds, sodium chlorate, and monuron; DB granular, a mixture of boron compounds and 2, 4-D; Ureabor, containing boron compounds and monuron; and Benjabor, which contains boron compounds and trichlorobenzoic acid, have been claimed (Stone and Rake, 1955), that boron has a biostatic effect on bacteria and fungi that attack herbicidal compounds such as 2, 4-D, and hence that it has a spring action towards these compounds. This may well explain the long residual control of weeds in soils treated with such mixture. Ammonium borate and sodium metabolite are other weedkillers.

CONCLUSION

In review, by the above stated information regarding the different roles of these micro nutrients with relation to soil pH, deficiency diseases, biosynthesis of chemicals, judicious use of fertilisers and diseases, pest, and weed control can enable the production of quality foliage and, ultimately, quality cocoon yield to be boosted up, which will be helpful in the expansion of sericulture in different parts of the country and abroad. It is highly necessary for micro nutrients to carry out further extensive research work on the above stated aspects where we can apply the results gradually at field level through demonstration on a pilot scale. Once a technology for micro nutrients is established and diversified, not only will the cost of production reduce much but it will also benefit the growers, reelers and traders.

REFERENCES

- ALI R., QAIYYUM M.A. (1991) A survey of weed flora of some mulberry fields in Bangladesh. Bull. Sericult. Res., 2(2), 48-53.
- ANONYMOUS (1989-90) Annual Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, pp 23-25.
- ANONYMOUS (1980) Textbook of Tropical Sericulture, Japan Overseas Co-operative Volunteers, Tokyo, Japan, pp. 85-89.

- BOSE P.C. (1987) Role of micronutrients in mulberry garden. *Indian Silk*, 25(3), 22-23.
- COOK W.H. (1937a) Chemical weed killers. I. Relative toxicity of various chemicals to four annual weeds. *Can. J. Res.*, 15, 299-323.
- DAS B.C., PRASAD D.N., RAJAN R., KRISHNASWAMI S. (1971) A survey of common weeds occurring in the mulberry farms of west Bengal. *Indian J. Serie.*, 10, 28-36.
- GOVINDAIAH, SENGUPTA K., SHARMA, D.D., GARGI, GUNASEKHAR V. (1989b). A new leaf spot disease of mulberry caused by *Myrothecium roridum*. *Tode ex. Fr. Current Sci.*, 58(7), 398.
- GUPTA O.P., LAMBA P.S. (1978) *Modern Weed Science*. Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi 5, India.
- HORIE Y., WATANABE K., ITO T. (1967) Nutrition of the silkworm, *B. mori*, XVIII. Quantitative requirements of potassium, phosphorous, magnesium and zinc. *Bull. Sri. Exp. Sta.*, 22(2), 181-193.
- HUBER D. M. (1980) The role of mineral nutrition in defence. *In Plant diseases, an advanced treatise*, Vol. V, J.G. Horsfall and E. E. Cowlings eds., Academic Press Inc., New-York. 381-406.
- ITO T., NIMINURA M. (1966) Nutrition of the silkworm, *B. mori* Linn., its specific nutrient requirements and its nutrition in relation to the mineral nutrition of its host plant mulberry, *Morus indica* Linn., *Indian J. Exp. Bio.*, 4, 31-36.
- JOLLY M.S. (1976) *Sericulture Manual I. Mulberry cultivation*. FAO Agricultural Services Bull., no 15.
- KANTI K.S.R. (1975) Studies on *Cercospora* leaf spot of mulberry (*Morus alba* L.) M. Sc. (Agri.) thesis submitted to Univ. Agricult. Sci., Hebbal, Bangalore, India.
- KANWAR J.S. (1969) Micronutrients: new dimensions in agriculture. *Indian Fmg.*, 18(10), 5-8 & 52.
- KRISHNASWAMI S., KUMARARAJ S., VIJAYARAGHAVAN K., KASIVISWANATHAN K. (1971) Silkworm feeding trials for evaluating the quality of mulberry leaves as influenced by variety, spacing and nitrogen fertilisation. *Indian J. Serie.*, 9(1), 79-89.
- LINDSAY W.L. (1979) *Chemical equilibria in soils*. Wiley Interscience, New York.
- LOKANATH R., SHIVASHANKAR K. (1986) Effect of foliar application of micronutrients and magnesium on the growth, yield and quality of mulberry (*Morus alba* Linn.) *Indian J. Serie.*, 25(1), 1-5.
- LOKNATH R., SHIVASHANKAR K., KASIVISWANATHAN K., (1986) Effect of foliar application of magnesium and micronutrients in mulberry on the quality and production of cocoons, *Indian J. Serie.*, 25(1), 40-41.
- MANDAL S.R., BISWAS S., TEOTIA R.S. (1992). Management of root rot diseases of mulberry. *Indian Silk*, 30(10), 42-45.
- NIKITIN A.A. (1960) Section 1. Production and use of trace salts in fertilisers. *in: Chemistry and Technology of fertilisers* edited by Vincent Sauchelli, Reinhold Publishing Corporation, New York, p. 435.
- PIROME P.P (1978) *Diseases and pests of ornamental plants*. A Willey - Interscience Publication, John Willey & Sons, New York, pp 363.
- RADEMACHER B. (1940) The control of weeds in Germany, *Imp. Bur. Pastures and Forage Crops Bull.*, 27, 68-112.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R., JOLLY, M.S. (1976) *Sericulture manual I. Mulberry cultivation*, FAO agricultural services bull. No. 15.
- RAY D., GUPTA B.K. (1974) Effect of micronutrients on the yield and chemical composition of mulberry leaf. *In: Annual Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, India*, pp 76-78.
- RUSSEL B.W. (1961) *Soil conditions and plant growth*. Longmans, Green and Co., New York.
- SCOTT H.D., BEASLEY S.D., THOMPSON L.F. (1975) Effect of lime on boron transport to and uptake by cotton. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 39, 1116-21.

- SHREE M.P. (1984) Control of mulberry stem canker disease caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat. Sericologia, 24, 325-331.
- SIKDAR A.K., KRISHNASWAMI S., BHARATHI A. (1981) Effect of weed competition on growth and leaf yield of mulberry. Indian J. Seric., 20, 7-10.
- SINGH K.P., TEOTIA R.S., GOWDA P. (1992) Agricultural practices of soil for mulberry cultivation. Indian Silk, 31(1), 33-37;
- SINGH K.P. (1992) Mineral deficiency diseases and role of nutrients in mulberry disease control. Indian Silk, 31(2), 41-44.
- SINGH K.P., TEOTIA R.S., SEN S.K. (1994) Role of secondary macronutrients in mulberry cultivation. Sericologia, 34(3), 401-413.
- SINGHVI M.R., BOSE P.C. (1990) Using foliar fertilisation to increase the productivity of mulberry. Indian Silk, 29, 87-88.
- SRINIVASAN E.B. SUBBASWAMY M.R., SIKDAR A.K., BHARATH A., JOLLY M.S. (1987) Effect of weed density on nutritive value of mulberry (*Morus indica* L.). Indian J. Seric., 26(2), 72-75.
- SUBBA RAO G. (1989) Field book of sericulture for extension management. Central Silk Board, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, India.
- SUBBASWAMY M.R., REDDY M.M., HIMANTHARAJ M.T., SINHA A.K. (1995) Importance of zinc nutrition in mulberry. Indian Silk, 34(2), 10.
- STONE J.D., RAKE D.W. (1955) Effect of borate additives on herbicides. Agr. Chem., 10(5), 36-39.
- TANDON H.L.S. (1989) Secondary and micronutrients recommendation for soil and crops. A guide book. Fertiliser Development and Consultation Organisation, New Delhi, India, 48, pp 81.
- TEOTIA R.S., MANDAL S.R., SENGUPTA K. (1992b) Effect of foliar sprays of macro and micronutrients on the susceptibility of mulberry to leaf rust and powdery mildew diseases. Nat. Conf. Mulberry Seric. Res., 10-11 December 1992, Central Sericulture Research and Training Institute, Mysore, India (Abstract), pp 59.
- VIJAYA B.A., RAZI B.A. (1977) Studies on the weed flora of mulberry gardens. Part II: Enumeration of Weeds. Indian J. Seric., 16, 19-33.
- VISHWANATH A.P. (1979) Effect of foliar spray of micronutrients on the yield and quality of mulberry (*Morus alba* Linn). M. Sc. Thesis University of Agriculture Science, Bangalore.
- VISHWANATH A.P., KRISHNAMURTHY K. (1982-83) Effect of foliar spray of micronutrients on the larval development and cocoon characters of silkworm (*B. mori* Linn.), Indian J. Seric., 2, 1-6.

MICRONUTRIMENTS DANS LA CULTURE DU MURIER (*MORUS ALBA* LINN)

K.P SINGH

Publications & Information Directorate, Dr K. S. Krishnans Marg, New Delhi - 110 012, Inde.

INTRODUCTION

L'importance du mûrier (*Morus alba* Linn) comme culture séricicole est illustrée par sa culture à grande échelle dans le monde entier. Pendant l'année de production 1994-1995 une quantité totale de 1955,862 tonnes de toutes les qualités de soie grège correspondant à 177 791 240 roupies s'est échangée aux neuf bourses d'échange de la soie au Karnataka, contre 1924,039 tonnes d'une valeur de 140 362 680 roupies pour la période correspondante l'année précédente, ce qui représente une hausse de 1,7 % en quantité et de 26,7 % en valeur (Indian Silk, 1995, 34(1), 58).

Les micronutriments, c'est à dire le fer, le manganèse, le bore, le cuivre, le zinc et le molybdène, appelés aussi éléments traces ou élément mineurs sont aussi essentiels que les nutriments secondaires ou majeurs pour la croissance de la plante. Ils sont « mineurs » dans le sens où leur reconstitution dans le sol aux doses nécessaires après une carence se fait comparativement avec des quantités beaucoup plus petites. Ils ont une fonction dans la photosynthèse, dans la respiration et en tant qu'enzymes comme catalyseurs. Les micronutriments ont donc un rôle vital par rapport aux cultures et par conséquent sur les produits animaux. Cependant, récemment, l'intérêt pour l'utilisation de micronutriments a grandement augmenté à cause de la consommation élevée d'engrais, de la culture intensive et de l'utilisation de variétés de culture à haut rendement.

La croissance et le développement des larves de ver à soie (*Bombyx mori* Linn.) et les caractéristiques physiques des cocons telles que leur taille, leur forme, leur poids, etc., sont grandement influencées par le contenu en nutriments des feuilles de mûrier (Krishnaswami et coll., 1971). L'utilisation de macro et de micronutriments a augmenté la qualité et la quantité des feuilles de mûrier et le rendement en cocons (Roy et Gupta, 1974 ; Vishwanath, 1979 ; Singh et coll., 1994). Cependant, l'information concernant les micronutriments par rapport à la croissance de la plante en général et du mûrier en particulier est particulièrement maigre (Lokanath et Shivashankar, 1986). La maîtrise de l'administration de micronutriments en fonction du pH, des conditions géologiques, des maladies de carence, de la biosynthèse des produits chimiques, leur usage judicieux en tant qu'agents d'amendement du sol, par rapport aux maladies, aux insectes, au contrôle des mauvaises herbes sont essentiels afin de répondre à la demande en soie toujours à la hausse. Cela concerne jusqu'à présent la qualité et la quantité de feuilles et la production de cocons de mûrier.

ROLE DES NUTRIMENTS EN FONCTION DU PH DU SOL

Le mûrier peut être cultivé à la fois dans des sols acides et dans des sols alcalins. Des sols très acides et très alcalins affectent la croissance de la plante de manière défavorable. Les sols légèrement acides ayant un pH de 6,2-6,8 sont idéaux pour la culture du mûrier. Selon Barber (1984), les rapports entre le pH du sol et les micronutriments s'établissent comme suit :

Fer :

La présence de fer sous forme hydroxyde (OH) Fe^{++} et Fe^{+++} dans le sol dépend à son tour du pH et du pc, un paramètre lié au potentiel d'oxydoréduction. L'activité Fe^{+++} calculée est maintenue par des oxydes de fer et le fer du sol en fonction du pH. Le calcul du fer dans le sol se fait à partir d'un log KO de - 39,3 pour la relation $\text{Fe}(\text{OH})_3 (\text{Sol} \rightleftharpoons \text{Fe}^{+3} + 3\text{OH})$. L'activité de Fe^{+3} baisse de 1000 fois pour chaque unité quand le pH augmente.

La valeur exacte de l'activité Fe^{+3} peut changer en fonction des formes de fer présentes. Si l'équilibre est lent, les niveaux d'activité Fe^{+3} peuvent être plus élevés.

Manganèse :

Le manganèse en tant que pyrolusite et manganite peut être calculé à partir de la relation des produits de solubilité. La Solution de Mn^{++} est influencée par le pH et l'activité électronique pc, c'est à dire $\text{pH} + \text{pc} = 16,62$ (Linday, 1979).

La relation entre le pH et Mn^{++} en solution avec la manganite peut être calculée à partir de la réaction.

$$\begin{aligned}\text{Log Mn}^{++} &\rightleftharpoons 25,57 - (\text{pc} + \text{pH}) - 2\text{pH} \\ &= 25,57 - 16,62 - 2\text{pH} \\ &= 8,65 - 2\text{pH}\end{aligned}$$

Ainsi, l'activité calculée baisserait de $4,5 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ à un pH de 5,0 à $4,5 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ à un pH de 8,0. Les valeurs pH sont beaucoup plus élevées que celles que l'on trouve généralement pour la solution du sol. Ainsi, seule la solubilité gouverne l'activité Mn^{++} pour les solutions du sol. Les valeurs calculées à un pH 8,0 sont beaucoup plus faibles que ce qui serait nécessaire à la solution dans le sol pour fournir du manganèse à la racine.

Bore :

Un pH de sol en hausse réduit le niveau de bore disponible dans le sol. Scott et coll. (1975) ont observé que l'augmentation du pH du sol diminue le coefficient de diffusion apparent du bore dans le sol et augmente la quantité de bore ajouté absorbée par le sol. La diminution des concentrations en bore dans le sol avec un pH croissant entraîne une diminution du taux d'alimentation en bore pour la racine. Plus tard, cela peut entraîner une absorption de bore plus élevée dans le sol, ayant pour conséquence des niveaux de bore plus faibles pour la solution du sol.

Cuivre :

Plus le pH augmente, plus le cuivre est absorbé. La matière organique (sol de tourbe) absorbe le cuivre à des valeurs de pH plus faibles que la montmorillinite. Les données s'accordent avec la supposition que la matière organique est du cuivre. Du chlorure de calcium est ajouté pour minimiser toute absorption de cuivre échangeable.

Zinc :

Le pH du sol a un effet important sur l'absorption de zinc. La concentration en zinc minimale est comprise entre un pH de 7,0 à 8,0. La concentration en zinc dans la solution baisse de 30 fois à chaque fois que le pH augmente d'une unité, pour les gammes de pH comprises entre 5,0-7,0. On pense que la baisse de la concentration Zn^{++} dans la solution pour le sol Mardin est due à l'absorption d'oxydes en surface. Le niveau de zinc dans la solution pour un pH de sol spécifique dépend de la nature du sol en surface et du niveau de zinc dans le sol. Là où l'on trouve des oxydes en surface le niveau de zinc, est en général plus faible dans la solution. Pour des niveaux de pH élevés, si du carbonate de calcium est présent, le niveau de zinc dans la solution est plus faible. A des valeurs de pH au-dessus de 7,5, le niveau de zinc complexé dans la solution dépend de la solubilité de la matière organique, qui à son tour, dépend de la présence de calcium et d'autres cations qui peuvent supprimer sa solubilité.

Molybdène :

La teneur en molybdène d'une plante cultivée dans un sol de pH 5,0 doublera en moyenne si le sol est chaulé à un pH de 6,0 et sera multipliée par six si le sol est chaulé à un pH de 7,0. La quantité de molybdène instable mesuré par extraction avec une résine échangeuse d'anions augmente aussi (Bhella et Dawson, 1972). L'absorption de molybdène par la plante baisse quand le pH augmente. Bien que cet effet soit évidemment éclipsé par l'augmentation de molybdène, les niveaux peuvent augmenter de 10 fois quand le pH du sol augmente d'une unité. Quand on ajoute du molybdène au sol, la quantité absorbée baisse alors que le pH augmente.

Généralement, la quantité de fer, de manganèse, de zinc, de cuivre et de bore baisse quand le pH du sol augmente entre 5 -7 tandis que la quantité de molybdène disponible augmente quand le pH augmente.

Présence de micronutriments en fonction du pH du sol :

La relation entre les micronutriments et le pH du sol pour le mûrier s'établit comme suit :

Bore : Le symptôme d'une carence en bore est lié à des valeurs de pH élevées, et l'absorption de bore par les plantes baisse quand le pH du sol augmente.

Cuivre : La quantité de cuivre échangeable baisse alors que le pH augmente.

Fer : La plupart des carences en fer sont liées à un pH de sol élevé.

Manganèse : La carence en manganèse est due en grande partie à un pH élevé.

Molybdène : La présence de molybdène augmente avec le pH du sol.

Zinc : Le zinc est en général plus disponible pour les plantes dans les sols acides que dans les sols alcalins.

[Source : Bose, P.C; (1987), Indian Silk, 25(3), 22-23.]

CARENCE EN MICRONUTRIMENTS DES SOLS

On observe que les carences en nutriments dans le sol limitent le rendement potentiel maximum et la qualité des feuilles de mûrier. A cause de l'appauvrissement continu du sol en micronutriments par le mûrier, les sols deviennent déficients en éléments traces. On peut se faire une idée du contenu total en micronutriments des sols Indiens d'après les données qui suivent :

Contenu total en micronutriments dans les sols indiens :

Manganèse	300-1000 ppm
Zinc	10-300 ppm
Cuivre	1-100 ppm
Bore	7-630 ppm
Molybdène	0,2 - 5,0 ppm
Chlore	12-50 ppm
Fer	0,46-27,5 pour cent

[Source : Kanwar, J.S. (1969), Indian Fmg, 18(10), 5-8]

En général, le contenu du sol en micronutriments est comme suit :

Fer :

Dans les sols calcaires les sels ferreux disponibles sont en général convertis en sels ferreux non disponibles à cause de l'alcalinité. Dans les sols acides, le fer est en général disponible mais si un excès de phosphate soluble est présent, il se peut qu'il devienne non disponible. Les composés en fer chélaté administrés au sol sont beaucoup plus efficaces que les composés de fer inorganiques simples pour les sols acides. Le fer peut devenir toxique si les sols qui contiennent beaucoup de fer deviennent fortement acides.

Manganèse :

Le manganèse est présent dans le sol sous de nombreuses formes mais il est en grande partie absorbé sous la forme d'ion réduit de manganèse (Mn^{++}). Comme le fer, le manganèse peut devenir déficient quand il s'oxyde ou dans les sols alcalins parce qu'il est converti en formes non disponibles.

Bore :

Il est présent en petites quantités dans la plupart des sols mais sa présence est souvent extrêmement faible parce qu'il est étroitement imbriqué dans la structure du sol. L'absorption de bore est faible dans les sols riches en calcium, et le chaulage tend à réduire son absorption, ce qui suggère que le calcium complexe le bore, le précipite dans le sol ou diminue la capacité des racines à l'absorber.

Cuivre :

Le cuivre est presque universellement présent en petites quantités et est continuellement réapprovisionné grâce à l'altération à l'air des minéraux contenant du cuivre. Il est normalement présent dans le processus d'échange des sols où il est étroitement retenu mais est accessible pour les plantes, de sorte que la nature de sa carence est inconnue. Cependant, l'utilisation excessive d'engrais avec du phosphate réduit peut-être la présence de cuivre en entraînant la formation de précipités insolubles.

Zinc :

Les sols alcalins et salins entraînent de sévères carences en zinc mais il est très répandu dans les sols calcaires grâce à des produits faiblement solubles comme les complexes et les carbonates de zinc. Pendant les périodes froides, la présence de zinc est restreinte et il y a une forte érosion du sol due à la perte en nutriments essentiels à la surface du sol.

Molybdène :

Le molybdène est normalement présent dans le sol sous forme oxydée, en l'occurrence sous forme d'ions de molybdate ($MoSO_4$) de calcium et d'autres métaux. Le contenu en molybdène des sols peut monter jusqu'à 20 ppm - 30 ppm ou même plus. La solubilité de cet ion augmente alors que le pH augmente. Les carences en molybdène sont donc plus susceptibles de survenir dans les sols acides. Dans le cas où les nitrates sont la seule source d'azote du sol et la présence de molybdène est inférieure aux quantités requises, cela affecte grandement l'assimilation de nitrate.

Les niveaux en micronutriments nécessaires à la croissance des plantes de grande taille, le mûrier y compris sont:

1. Molybdène	0,1ppm
2. Cuivre	6,0 ppm
3. Zinc	20,0ppm
4. Bore	20,0ppm
5. Manganèse	50,0ppm
6. Fer	00,0ppm
7. Chlore	100,0ppm

[Source : Bose, P.C. (1987). Indian Silk, 25(3), 22-23]

MALADIES DE CARENCES

Toutes les plantes cultivées souffrent de carences en minéraux et le mûrier n'est pas une exception (Rangaswami et coll, 1976) mais les symptômes de carence en micronutriments du mûrier en milieu réel ne sont pas clairs. Cependant des caractéristiques telles que le jaunissement ou le rougissement des feuilles qui apparaissent en premier à la pointe et qui s'étendent aux zones entre les nervures de la feuille, surtout pour les vieilles feuilles, rendent finalement les feuilles marron. Selon Bose (1987) les symptômes de carence en micronutriments sont les suivants :

No. SI	Éléments	Symptômes de carence
1	Fer	Apparence de chlorose sur les feuilles les plus jeunes et verdissement des nervures médianes des feuilles
2	Manganèse	Contour bosselé et condition chlorotique des feuilles de mûrier, pourrissement entre les nervures.
3.	Bore	Croissance ralentie, les tissus jeunes peuvent se désintégrer et faire craquer, noircir la plante ou la rendre de forme anormale.
4.	Zinc	Conditions chlorotiques des feuilles de mûrier. Cela provoque aussi la coloration de la feuille d'un jaune roussâtre et marron, parfois avec de nervures assombries.
5.	Cuivre	Flétrissure des feuilles supérieures tendres et mort des pointes de la feuille de mûrier souvent sans changement de couleur.
6.	Molybdène	Mouchetage chlorotique entre les nervures des feuilles inférieures, suivi d'une nécrose marginale et la feuille ne réussit pas à se développer.

BYOSYNTHESE DES PRODUITS CHIMIQUES

Bidwell (1979) a signalé dans son livre devenu un classique que les micronutriments jouent un rôle majeur dans la synthèse de produits biochimiques variés chez les plantes. La fourniture adéquate en nutriments minéraux pour les plantes permet la synthèse de produits chimiques variés qui sont nécessaires pour assurer diverses fonctions dans le métabolisme et la croissance générale. Le rôle des micronutriments dans la biosynthèse des produits chimiques est le suivant :

Fer :

Le fer fait partie du site catalytique de nombreuses enzymes importantes, d'oxydation-réduction et est essentiel à la formation de la chlorophylle. On observe aussi l'importance du fer dans les protéines hémiques, les cytochromes et la cytochrome oxydase de la chaîne de transport des électrons. Il est important pour les enzymes d'oxydation, la catalase et la peroxydase et pour les enzymes respiratoires contenant du fer. Le fer est un composant de plusieurs enzymes non hème telles que les flavoprotéines et est extrêmement important pour l'agent de transfert des électrons, la ferrédoxine. De plus, le fer est peut être impliqué structurellement dans les lipides lamellaires du noyau, les chloroplastes, les mitochondries et la synthèse des protéines des membranes.

Manganèse :

Le manganèse joue un rôle important pour la catalyse enzymatique, en activant les métaux dans la respiration, les réactions du métabolisme azoté et la photosynthèse. Il est nécessaire à la nitratre réductase et au métabolisme de l'acide indol acétique. Le rôle le plus important du manganèse dans la photosynthèse se situe dans la séquence des réactions par lesquelles les électrons sont dérivés de l'eau et l'oxygène libéré. Le manganèse a peut être aussi un rôle structurel dans le chloroplaste qui devient sensible à la lumière en son absence et finalement perd sa structure et se désintègre en cas de manque extrême. La structure des mitochondries et des noyaux ne semble pas être affectée de la même manière, ce qui indique que le rôle du manganèse dans le chloroplaste, à la différence du fer, est peut-être très spécifique.

Bore :

Le transfert et l'absorption de sucres sont très réduits en l'absence de bore, et on a suggéré que les sucres sont déplacés sous la forme de complexes de borate. On trouve que les sucres radioactifs sont plus facilement absorbés à travers la surface foliaire si on ajoute des petites quantités de borate simultanément et l'addition de bore augmente la translocation des produits radio-actifs de la photosynthèse en $^{14}\text{CO}_2$. Il est suggéré que le bore est impliqué dans de nombreux aspects de la différenciation de la cellule et le développement.

Cuivre :

Le cuivre joue exclusivement un rôle catalytique dans les plantes, étant une partie importante des enzymes telles que la polyphénol oxydase et l'oxydase de l'acide ascorbique. Il est présent dans la plastocyanine du chloroplaste, un membre important du système de transport des électrons photosynthétiques et est peut-être impliqué dans la réduction de nitrite.

Zinc :

Il est directement impliqué dans la synthèse de l'acide indol acétique (IAA), et son manque peut entraîner des changements substantiels sur la forme et la croissance de certaines espèces, produisant des plants raccourcis et à la croissance retardée avec une dominance apicale peu développée. De plus, le zinc est un activateur obligatoire de certaines enzymes telles que l'acide lactique, l'acide glutamique, l'alcool et la pyrimidine nucléotide déhydrogénases. Le zinc semble être impliqué dans la synthèse des protéines. Il est impliqué dans diverses activités métaboliques essentielles comme le métabolisme de l'auxine, la synthèse des protéines et des acides nucléiques et le métabolisme des hydrates de carbone. Ses interrelations avec l'auxine jouent un rôle dominant dans la régulation de l'allongement de la tige et la croissance de la cellule (Subbaswamy et coll., 1995).

Molybdène :

Le molybdène joue un rôle actif dans la réduction de nitrate et la fixation de l'azote et sa carence conduit à un contenu en azote organique réduit. Cela peut entraîner des symptômes de carence en azote qui rendent la carence en molybdène difficile à détecter. Cependant, le molybdène a évidemment d'autres fonctions parce que la plupart des plantes ont besoin de molybdène même quand elles sont cultivées en présence d'engrais ammoniacés.

AMELIORANTS DES SOLS ET ENGRAIS

Il est de notoriété que pour augmenter le rendement en feuilles dans une zone de terre particulière, on ne peut pas seulement compter sur la fertilité du sol et l'on doit avoir recours à l'application d'engrais et de fumier. Le rôle des micronutriments comme engrais et leur effet sur le mûrier sont les suivants :

(i) Addition de micronutriments par amendements avec des engrais et du fumier :

On réalise rarement que les engrais inorganiques et le fumier organique apportent aussi certains micro-nutriments. L'addition dépendra de la source, de la nature et de la quantité d'engrais. Des centaines de kg/ha d'engrais contenant 100 ppm de micronutriments augmenteront le contenu en micronutriments du sol seulement de 10 grammes. Le contenu en micronutriments, d'engrais importants et du fumier est présenté dans le tableau I

Dans le cas du superphosphate, des scories de base et des matériaux de chaulage les sources de la matière première déterminent le contenu en micronutriments. Ainsi, on peut s'attendre à de larges variations dépendant de la source de la matière.

Selon Hemingway, les quantités de micronutriments ajoutées pour 10 tonnes de FYM (fumure) sont équivalentes à 1450 grammes de sulfate de manganèse, à 420 grammes de borax, à 170 grammes de sulfate de cuivre, à 14 grammes de sulfate de cobalt et à 14 grammes de molybdate de sodium. Ainsi, la quantité ajoutée par FYM, bien que plus élevée que les engrais, n'est pas adaptée pour corriger la carence en micronutriments du sol à cause de la faible teneur en micronutriments et de leur disponibilité plus faible. D'un autre côté, les produits de chaulage et les scories de base sont des sources plus riches en certains micronutriments et leur utilisation comme amendements du sol a l'avantage supplémentaire de fournir des micronutriments.

Comme les engrais et le fumier, les eaux d'irrigation en particulier les eaux d'irrigation salines contribuent aussi au contenu en micronutriments des sols. La contribution des eaux d'irrigation en chlorures et en bore peut être substantielle et dans certains cas peut même être toxique.

Les taux habituels d'application des micronutriments au sol ou par vaporisation sont présentées dans le Tableau II.

La plupart des éléments disponibles sous forme d'oxydes, de carbonates, de sulfures et de silicates qui sont des sources ou des porteurs, sont présentés dans le tableau III.

La composition de certains sels acides solubles et des sels de sulfure utilisés en traitements foliaires et du sol sont présentés dans le tableau IV.

D'autres porteurs de micronutriments qui sont compris dans l'arrêté de contrôle sont présentés dans le Tableau V.

ii) Effet sur le mûrier :

Fer :

Le sulfate de fer contient 19 % de fer et est utilisé comme engrais dans les mûraies. L'application d'une vaporisation foliaire de fer à 2,50 kg/ha et 5,0 kg/ha donne une amélioration significative de la production de feuillage. Le rendement kg/ha/année est plus élevé pour les concentrations faibles que pour les concentrations élevées. Le nombre de feuilles, le nombre de branches, la surface de la feuille et le rendement/plant en feuillage augmentent sensiblement. Sur le plan qualitatif, le taux d'humidité, les protéines, les sucres réducteurs et non-réducteurs et les hydrates de carbone montrent une amélioration significative par rapport au témoin. Selon Ito et Niminura (1966), Horie et coll., (1967), le fer est essentiel pour l'élevage du ver à soie. Du point de vue de la nutrition, on observe que le fer a une potentialité à améliorer le développement larvaire et les rendements en cocons. Le fer à 5 kg/ha donne des rendements en cocons plus élevés.

Manganèse :

Le sulfate de manganèse contient 26 pour cent de manganèse et s'applique habituellement pour pallier la carence en manganèse dans les mûraies. Vishwanath (1979) et Lokanath et Shivashankar (1986) ont obtenu une augmentation du rendement en feuilles avec 2,5 kg/ha et 1,25 kg/ha de manganèse par vaporisation foliaire. Ray et Gupta (1974) ont observé un rendement en feuilles plus élevé pour les doses faibles que pour les fortes doses. Les protéines, les sucres, l'amidon, les hydrates de carbone et les fibres brutes sont plus élevés pour les doses faibles que pour les doses élevées mais le taux d'humidité et les contenus en autres minéraux sont plus élevés à fortes doses. Le manganèse est essentiel pour l'accélération de la croissance du ver à soie (Ito et Niminura, 1966 ; Horie et coll., 1967). Lokanath et coll., (1986) ont observé que le manganèse a une potentialité à améliorer le développement larvaire et le rendement en cocons. Vishwanath (1979) a aussi signalé que le poids larvaire et la richesse soyeuse sont élevés quand la concentration est faible tandis que le rendement en cocons, le poids des nymphes, le poids unitaire du cocon et la richesse soyeuse sont élevés pour des doses fortes par rapport au témoin.

Bore :

Le borax contient 10,6 pourcent de bore et est utilisé dans les mûraies. Lokanath et Shivashankar (1986) ont vaporisé de l'acide borique à raison de 2,00kg/ha et 4,00 kg/ha et ont observé que le rendement en feuilles est plus élevé à doses faibles tandis que les doses élevées ont un effet adverse sur le nombre de branches, de feuilles et la superficie de la feuille. Peut-être que 4,00 kg/ha est trop élevé et toxique, tandis qu'une dose faible ne s'exprime pas complètement mais améliore les caractéristiques de croissance/rendement. D'après des études qualitatives, une dose faible est meilleure qu'une dose élevée. Lokanath et coll. (1986) ont observé qu'une dose de 4,00 kg/ha produit des rendements de cocon, une richesse soyeuse et des rendements à la bassine élevés, le poids de soie pour 10 cocons varie de manière marginale entre 1,23 - 1,48 g et celui des déchets de soie est compris entre 0,14 - 0,18 g/10 cocons. Le rendement à la bassine moyen est de 7,87. Cela signifie que le bore améliorerait le développement larvaire et le rendement en cocons.

Cuivre :

Le sulfate de cuivre contient 25.6 % de cuivre et est utilisé comme engrais dans les mûraies. En général, il est appliqué en vaporisation foliaire avec un mélange de $\text{CuSO}_4 + \text{Ca(OH)}_2$. Ray et Gupta (1974) ont observé que le rendement en feuillage est plus élevé à une faible concentration par rapport au témoin et à une dose élevée. Des études biochimiques ont permis d'observer que le pourcentage d'humidité, les minéraux, les protéines, les sucres et les hydrates de carbone totaux sont plus élevés avec des doses faibles tandis que les teneurs en amidon et en fibres brutes sont plus élevées avec une dose forte par rapport aux doses faibles et au témoin.

Zinc :

Le sulfate de zinc contient 36 % de zinc et est utilisé comme engrais pour combattre les carences dans les mûraies. La carence en zinc peut être corrigée par l'application dans le sol de sulfate de zinc commercial dans les mûraies. L'application foliaire d'une solution de sulfate de zinc (0,5 - 1 %) est aussi recommandée pour les biomasses sur pied. Le sulfate de zinc commercial est appliqué à des doses différentes avec du fumier dans les mûraies déficientes en zinc. Les résultats indiquent une amélioration significative du rendement en feuilles et une réduction considérable du coût quand du sulfate de zinc est ajouté à raison de 3 kg/ha et 5 kg/ha (Subbaswamy et coll., 1995). Ray et Gupta (1974), et Lokanath et Shivashankar (1986) ont obtenu une amélioration du rendement en feuilles de mûrier avec une application foliaire. Vishwanath et Krishnamurthy (1982-83) ont observé que le zinc donne une efficacité maximale d'absorption de 80,5 % à 5 kg/ha. Des études précédentes menées par Horie et coll. (1967) indiquent l'importance du zinc pour une meilleure croissance du ver à soie. Le rendement en cocons s'élève à 386,82 kg/ha pour une vaporisation au zinc de 10 kg/ha.

Molybdène :

Le molybdate d'ammonium contient 54 % de molybdène et est utilisé dans les mûraies. Dans certains cas, les déchets en molybdène de l'industrie des lampes électriques sont utilisés comme engrais. L'ammonium ou le molybdate de sodium sont appliqués comme apprêt foliaire (0,028 - 0,035 kg/ha) ou au sol (0,07 - 2,3 kg/ha), bien que la dose recommandée à appliquer pour le mûrier reste encore à déterminer. Il est aussi évident que la vaporisation de molybdène sur les feuilles de mûrier augmente le pourcentage d'humidité (2 %), les protéines (2,8 - 6,3 %) et le contenu en minéraux (4 - 7 %) et à un certain degré le rendement en feuilles de 0,869 % par rapport au témoin.

MALADIES ET INSECTES

Selon Singh (1992), on ne dispose pas d'information sur la lutte contre les maladies du mûrier par les fongicides ou les insecticides excepté pour les fongicides au cuivre. On ne dispose que de quelques informations concernant « Tracet » un composé de micronutriments contre la maladie de l'oïdium poudreux. Pour des informations supplémentaires des recherches sont toujours en cours sur « Plantonic », un composé en micronutriments récemment produit, qui donne le même type de résultats. Mais pour la correction de ces maladies de carences en minéraux, on peut utiliser des composés de micronutriments. Le tétraborate de sodium, un composé de bore sous la forme de borax, peut être appliqué sur le feuillage. Le fer sous la forme de sulfate en application foliaire est utile pour la correction de la chlorose de la feuille. L'application de composés de fer chélaté ou de sulfate de fer dans le sol permet de contrôler la maladie de la chlorose. Le manganèse sous forme de sulfate est habituellement appliqué pour venir à bout de la carence en manganèse dans une mûraie. Le molybdate de sodium ou une solution de molybdate d'ammonium sont en général utilisés comme engrais vaporisés sur les feuilles pour éliminer les symptômes de carence en molybdène des plants de mûrier. L'application foliaire de zinc sous forme de sulfate est utilisée pour supprimer le rougissement de la feuille de mûrier, un symptôme de carence en zinc (Vishwanath, 1979). Le plus vieux fongicide parmi les fongicides au cuivre est la bouillie bordelaise. Les maladies du mûrier contre lesquelles on peut lutter avec des fongicides à base de cuivre sont présentées dans le tableau VI.

LUTTE CONTRE LES MAUVAISES HERBES

Les mauvaises herbes sont une menace importante pour toutes les cultures et le mûrier n'est pas une exception (Das et coll, 1971 ; Vijay et Rizvi, 1977 ; Ali et Qaiyyum, 1991). Non seulement elles rivalisent avec le mûrier en nutriments, en humidité, en lumière et en espace mais elles servent aussi d'hôte alternatif et collatéral pour les pathogènes (Govindaiah et coll, 1989). Srinivasan et coll., (1987) ont signalé que des densités en mauvaises herbes de 4, 8, 16 et 32 mauvaises herbes par m² réduisent la teneur en nutriments de la feuille de mûrier et la perte en résultant est de l'ordre de 4590 à 8650 kg d'humidité, 302 à 571 kg de protéines brutes, 389,43 à 72,37 kg de sucres réducteurs et 219,7 à 449,9 kg d'hydrates de carbone totaux. La concurrence entre les mauvaises herbes et la plante a été étudiée chez le mûrier par rapport à la perte de rendement en feuilles (Sikdar et coll, 1984).

Le désherbage manuel bien que très efficace, est une opération qui demande du temps et de la main d'œuvre. De nos jours, la main d'œuvre est de plus en plus chère et les marges en baisse des normes quotidiennes et la demande en hausse constante posent des problèmes dans le travail. Il a été suggéré d'employer des désherbants pour faire face à cette menace. Les micro-nutriments peuvent aussi être utilisés comme désherbants.

Rademacher (1940) en France et Bolley (1908) en Amérique ont observé que des solutions de sels de cuivre en application mélangées sur les mauvaises herbes à grandes feuilles chez les céréales tuent les premières sans dommage à ces dernières. Gupta et Lamba (1978) ont rapporté que le sulfate de cuivre est l'algicide le plus ancien et le plus utilisé dans le monde. Des taux de 0.1 - 1.0 ppm sont utilisés pour contrôler les mauvaises herbes des eaux stagnantes et de 1.5-2 ppm pour *Chara*. Il est utilisé avec le diquat pour contrôler *Hydrilla*. Le sulfate de cuivre est inefficace comme algicide à pH élevé et dans l'eau dure.

Cook (1937a) a observé que le chlorure de zinc est hautement toxique en vaporisation de contact sur quatre mauvaises herbes annuelles, dont l'avoine sauvage. Le sulfate est intermédiaire en toxicité parmi les 76 produits chimiques essayés.

Les composés de bore ont trouvé un usage très important dans le contrôle chimique des mauvaises herbes. Le poly-borochlorate et le chlorax qui regroupent des composés de bore avec du chlorate de sodium, la chlorée, qui contient des composés de bore, du chlorate de sodium et du monuron ; les granulés DB, un mélange de composés de bore et de 2,4-D ; l'Uréabor, qui contient des composés de bore et de monuron ; et le Benjabor qui contient des composés de bore et de l'acide trichlorobenzoïque sont censés (Stone et Rake, 1955), étant donné que le bore a un effet biostatique sur les bactéries et sur les champignons qu'attaquent les composés herbicides tels que 2, 4-D, avoir une action rebond envers ces composés. Cela peut très bien expliquer le long contrôle résiduel des mauvaises herbes dans les sols traités avec un tel mélange. Le borate d'ammonium et les métabolites du sodium sont d'autres désherbants.

CONCLUSION

En résumé, l'information ci-dessus concernant les différents rôles des micronutriments en fonction du pH du sol, des maladies de carence, de la biosynthèse des produits chimiques, de l'usage judicieux des engrais, contre les maladies, les insectes nuisibles et les mauvaises herbes peut permettre la production d'un feuillage de qualité, et finalement, l'accroissement du rendement en cocons de qualité, ce qui serait utile pour l'expansion de la sériciculture dans divers endroits du pays et du monde. Il est hautement nécessaire de poursuivre de plus amples recherches en profondeur en matière de micronutriments sur les aspects cités plus hauts. Cela permettra d'appliquer les résultats progressivement sur le terrain, par démonstration à l'échelle pilote. Dès qu'une technologie sur les micronutriments sera mise au point et diversifiée, non seulement le coût de production baissera de beaucoup mais cela profitera aux cultivateurs, aux filateurs et aux commerçants.

FEATURES OF LARVAL HAEMOLYMPH PROTEINS IN A PENTAMOLTING MUTANT OF *BOMBYX MORI* RESCUED BY THE APPLICATION OF A 1,5 - DISUBSTITUTED IMIDAZOLE

Y. KAWAGUCHI^{1*}, S. AKAGI¹, Y. BANNO¹, K. KOGA,¹E. KUWANO² AND H. DOIRA³

1. Laboratory of Sericultural Science,

2. Laboratory of Pesticide Chemistry and

3. Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka
812-81, Japan.

Artificial tetramolting larvae were induced by the application of an insect growth regulator, 1-benzyl-5[(E)-2,6-dimethyl-1,5-heptadienyl]-imidazole (KK-42), to the pentamolting mutant M⁵ of Bombyx mori shortly after the fourth molt. The total amount and electrophoretic patterns of haemolymph proteins of these "rescued" tetramolter larvae at the fifth (final) instar were similar to those at the sixth (final) instar of the sham-treated M⁵ and to those at the fifth (final) instar of the normal tetramolter. It is suggested that KK-42 brought about the omission of the fifth instar, the duplicated intermediary phase inherent in the M⁵ mutant.

Keywords: *Bombyx mori*, haemolymph proteins, pentamolting mutation, rescued tetramolter, insect growth regulator, KK-42.

INTRODUCTION

The concentration and constitution of the haemolymph proteins in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, change markedly during the larval development (Nakasone and Kobayashi, 1965; Kobara, 1967). On the basis of the quantitative and qualitative profiles of haemolymph proteins, we have proposed that the whole larval stages of *B. mori* could be divided into three phase, i.e., the nutritional growth (N) phase, the intermediary growth (I) phase and the reproductive growth (R) phase (Kawaguchi *et al.*, 1993, 1994). The N phase corresponds to the first to the third instars, when the concentration of total haemolymph proteins is low and there is no sexual difference in banding patterns. The proteins named PYLs-A and B (proteins of young larvae-A and B) predominated in the haemolymph at this phase (Fujiwara and Yamashita, 1990; Banno *et al.*, 1993). The I phase corresponds to the fourth instar (I), which seems to offer a period of switchover from the N phase to the R phase. The haemolymph protein concentration is still low without sexual difference. The R phase is the fifth instar in the rapid increase in concentration of overall haemolymph proteins. This was more marked in female than in male, mainly because the amount of the component named SP-1 (storage protein-1) or FL (female specific protein) rises only in female (Tojo *et al.*, 1980; Kawaguchi *et al.*, 1983), although other proteins including SP-2 (storage protein-2) increases in both sexes. FL

* Corresponding author

may serve as resource of yolk formation and thus the final instar is taken to be a period when the reproductive growth is already taking place.

The standard (normal) type of *B. mori* with respect to the molting is the tetramolter (Chikushi, 1972), which repeats five feeding stages and four molts until the onset of cocooning followed by pupation (Kawaguchi *et al.*, 1993, 1994). There are mutations wherein the number of molts is changed, e.g., a pentamolting mutant under goes six feeding stages and five molts (Doira, 1983, 1986). This trait is controlled by the *M^S* gene, which belongs to the sixth linkage group and is recessive to the normal tetramolting trait. The number of larval molting can also be altered artificially by anti-hormone compounds such as imidazole derivatives (Asano *et al.*, 1984a, 1984b, 1986a, 1986b). In particular, 1-benzyl-5-[(E)-2,6-dimethyl-1,5-heptadienyl]-imidazole (KK-42) has marked potency to induce trimolter larvae from normal *B. mori* strains and this was interpreted by its anti-ecdysteroid activity (Akai and Mauchamp, 1986; Kadono-Okuda *et al.*, 1987a, 1987b; Kuwano *et al.*, 1983, 1985, 1986, 1992; Yamashita *et al.*, 1987; Shimazu *et al.*, 1994). In the present study, we confirmed that the treatment with KK-42 restored the genetic pentamolter *M^S* to tetramolting larvae, and investigated the profiles of haemolymph proteins at the late larval instars of thus treated *M^S* population in comparison with those of sham-treated control and normal tetramolting larvae.

MATERIALS AND METHODS

Strain of the silkworm:

The strain used was t201, a stock in the Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University. It possesses the *M^S* gene at 24.1 cM of the sixth linkage group (6-24.1), the *E^{El}* (extra-crescents and extra-legs) gene (6-21.1) as a genetic marker and T(W:3)Ze (the sex-limited dominant zebra gene translocated to the W chromosome) as a sex marker (Doira, 1983, 1986); thus females (Ze) and males (+^{Ze}) can be discriminated at larval stages. This strain has been maintained by the cross T(W:3)Ze : *E^{El}* +/+*M^S* female × +*M^S* /+*M^S* male. In the next generation, the *E^{El}* heterozygotes with extra-crescents and extra-legs and the +^{Ze} homozygotes with normal markings and normal legs were segregated in a ratio of 1 : 1 within the same batches. The former were normal larvae (tetramolter) and the latter were *M^S* larvae (pentamolter) with the same genetic background. Both types of larvae were raised on mulberry leaves at 25° C and collected for the following experiments.

Treatment of larvae with KK-42:

KK-42 dissolved in acetone (0.1%, w/v) was applied (50 µg per larva) topically to the dorsal integument of the segregated pentamolter (*M^S*) larvae shortly after the fourth molt. At this dose, the treated larvae completely became tetramolters. Control larvae receiving the vehicle alone all remained to be pentamolters.

Preparation of haemolymph specimens:

Haemolymph specimens of KK-42 treated larvae was collected at 24 h intervals from day 0 (shortly after ecdysis) of the fifth instar to the onset of spinning. Control specimens were collected from acetone-treated pentamolting (*M^S*) larvae (from day 0 of the fifth instar to day 5 of the sixth instar) and from normal tetramolting larvae (from day 0 of the fourth instar to day 5 of the fifth instar). All were centrifuged to remove haemocytes as detailed previously (Kawaguchi *et al.*, 1993) and the supernatants were used for protein analyses as described below.

Quantitative and qualitative analyses of proteins:

The supernatants were treated with trichloroacetic acid (TCA, final 5%) at 5°C and the precipitates were washed three times with 5% ice-cold TCA and with ethanol: ether (1 : 1) to remove free amino acids and lipids and then dissolved in 0.1 N NaOH. The solution was measured for the total protein concentration by Folin method using filter paper tips with bovine serum albumin as a standard (Hayashi, 1983). Alternatively, the supernatants were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis

(Davis, 1964; Ornstein, 1964) using 6.5% slabs as detailed previously (Kawaguchi *et al.*, 1993). Protein bands were visualized by staining with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in ethanol: acetic acid: distilled water (4 : 1 : 5) for 1 h and destained in 7% acetic acid.

RESULTS

Changes in concentration of haemolymph proteins:

In the normal (+^M) tetramolting larvae (*E^{EI}* with the extra-crescents and extra-legs), the concentration of total haemolymph proteins was low during the fourth instar, with little difference between the sexes (Fig. 1A). At the fifth (final) instar, the concentration increased rapidly; the values were higher in female than in male. The pentamolting *M^S* larvae (+^E with the normal markings and normal legs) gave low values of haemolymph protein concentration at the fifth instar in both sexes

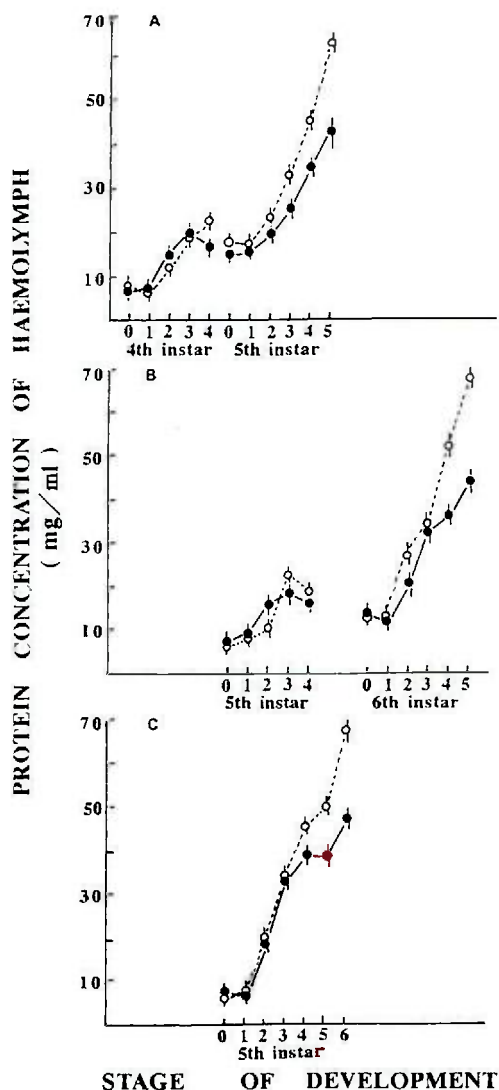


Fig. 1. Changes in concentration of haemolymph proteins in normal tetramolting larvae at the fourth and the fifth instars (A), in sham-treated pentamolting (*M^S*) larvae at the fifth and the sixth instars (B) and in artificially induced tetramolting (KK-42-treated *M^S*) larvae at the fifth instar (C). Each point represents the average of five measurements. Vertical bar, standard deviation. Open circles, females; closed circles, males.

Fig. 1. Changement dans la concentration des protéines de l'hémolymphe chez une larve tétramoltante normale aux quatrième et cinquième âges (A), chez une larve pentamoltante traitée à blanc (*M^S*) aux cinquième et sixième âges (B) et chez une larve tétramoltante artificiellement provoquée (*M^S* traitée au KK-42) au cinquième âge (C). Chaque point représente la moyenne de cinq mesures. La barre verticale, l'écart type. Les cercles ouverts, femelles ; les cercles fermés, mâles.

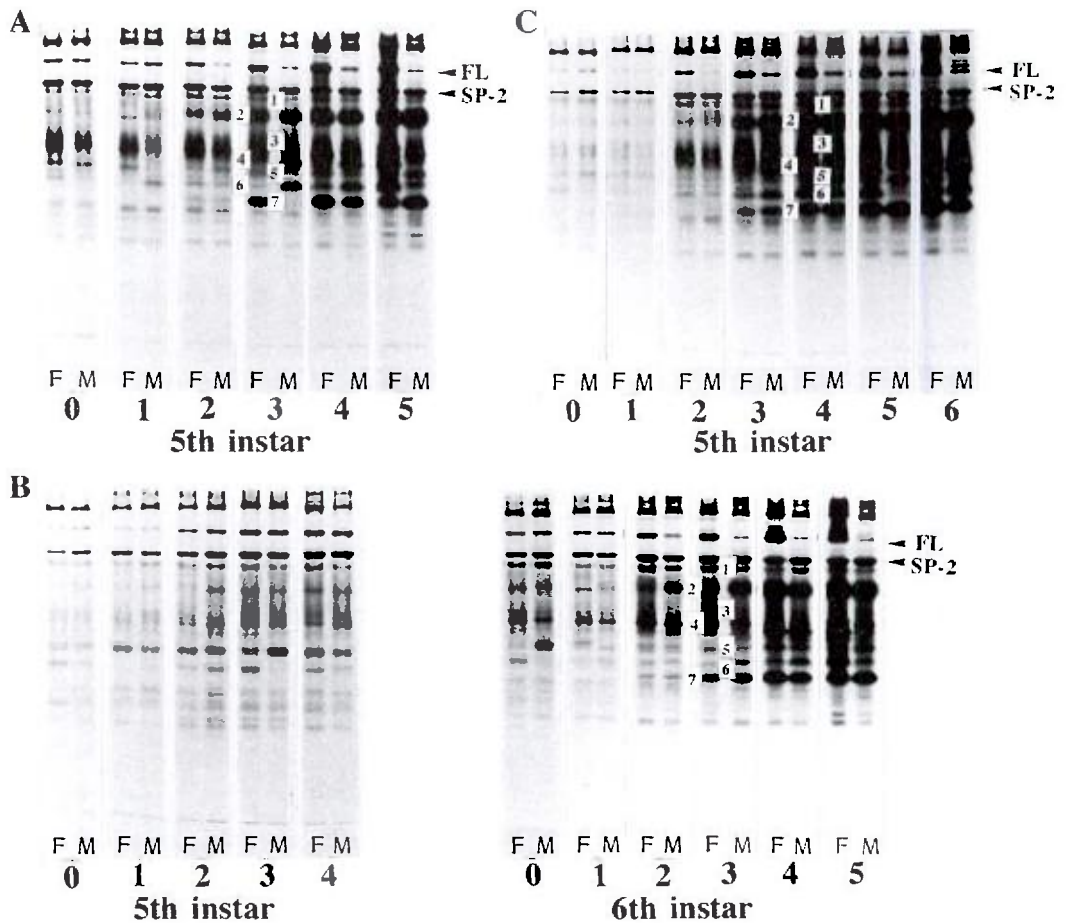


Fig. 2. Electrophoretic patterns of haemolymph proteins in normal tetramolting larvae at the fifth instar (A), in sham-treated pentamolting (M^5) larvae at the fifth and the sixth instars (B) and in artificially induced tetramolting (KK-42-treated M^5) larvae at the fifth instar (C). F, females; M, males. FL, female specific protein (or storage protein 1); SP-2, storage protein 2; Nos. 1-7, some of unspecified bands.

Fig. 2. Profils électrophorétiques des protéines de l'hémolymphe chez une larve tétramoltante normale au cinquième âge (A), chez une larve pentamoltante traitée à blanc (M^5) aux cinquième et sixième âges (B) et chez une larve tétramoltante artificiellement provoquée (M^5 traitée au KK-42) au cinquième âge (C). F, femelles; M, mâles. FL, protéine femelle spécifique (ou protéine 1 de stockage); SP-2, protéine 2 de stockage; Nos. 1-7, certaines des bandes non spécifiées.

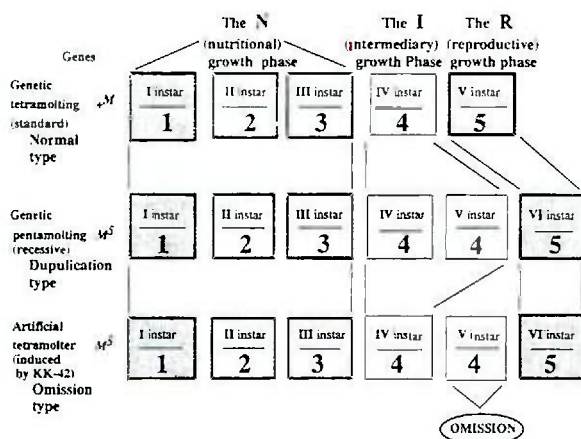


Fig. 3. Summarized features of larval haemolymph proteins after quantitative and qualitative analysis in normal tetramolting larvae, sham-treated pentamolting (M^5) larvae and artificially induced tetramolting (KK-42-treated M^5) larvae. Arabic numerals show the instars specified by the features of haemolymph proteins (the characteristics 1, 2, 3 and 4 are evident although without analyses in the present article, cf. Kawaguchi *et al.*, 1993, 1994). For the N, I and R phases, see text and Kawaguchi *et al.* (1993, 1994).

Fig. 3. Traits caractéristiques résumés des protéines de l'hémolymphe larvaire après une analyse quantitative et qualitative chez la larve tétramoltante normale, chez la larve pentamoltante (M^5) traitée à blanc et chez la larve tétramoltante (M^5 traitée au KK-42) artificiellement provoquée. Les chiffres arabes indiquent les âges spécifiés par les traits caractéristiques des protéines hémolympatiques (les caractéristiques 1, 2, 3 et 4 sont évidentes bien qu'elles ne soient pas analysées dans cet article, cf. Kawaguchi *et coll.*, 1993, 1994). En ce qui concerne les phases N, I et R, se reporter au texte et à Kawaguchi *et coll.*

(Fig. 1B). This feature resembled that of the fourth instar in the normal tetramolter (not shown). At the sixth (final) instar of M^5 , the concentration rapidly increased with a clear sexual difference, like the fifth (final) instar of the normal tetramolter. These results were the confirmation of our previous data (Kawaguchi *et al.*, 1993). On the other hand, the tetramolting larvae induced by KK-42 from the M^5 larvae were found to have a prolonged fifth (final) instar (6 days instead of the normal 4 days); the larvae began to spin cocoons on day 7 and in time became "precocious" M^5 pupae. The pattern of protein concentration in this induced tetramolter (Fig. 1C) was almost the same as those of the normal tetramolter at the fifth instar and the M^5 mutant strain at the sixth instar.

Changes in component of haemolymph proteins:

Electrophoretic analysis of haemolymph specimens from the normal tetramolting larvae at the fifth instar (Fig. 2A) revealed that the protein bands FL, SP-2 and others including those numbered 1 to 7 were weak in intensity on days 0 and 1, and increasingly strong after day 2 in both sexes. On this day and thereafter, the FL band was more marked in female than in male, in which this band remained faint. In the pentamolter (M^5) larvae, protein bands were weak and exhibited no difference both sexes at the fifth instar (Fig. 2B). At the sixth instar, however, the pattern resembled that at the fifth instar of the normal tetramolter. The overall results were again in agreement with the previously reported findings (Kawaguchi *et al.*, 1993). On the other hand, the induced tetramolting larvae (KK-42-treated M^5) gave the pattern with clear-cut sexual dimorphism of the FL band at the fifth (final) instar (Fig. 2C). This situation was found to be very similar to that at the fifth instar of the normal tetramolter and to the sixth instar of M^5 .

DISCUSSION

Above results confirmed that the treatment of pentamolting larvae (M^5) with the insect growth regulator KK-42 produced normal-like tetramolting larvae. We interpret this as a rescue of the pentamolter mutation. The features in concentration and constitution of haemolymph proteins during

the larval instars of this rescued tetramolter are summarized in Fig. 3, in comparison with those of the normal tetramolter and the sham-treated M^5 . It is worth noting that the M^5 mutant had the repeated I phases (specified by the Arabic numeral 4 in Fig. 3) as reported previously (Kawaguchi *et al.*, 1993). We suggest that the rescue occurred by skipping the fifth instar, one of the two I phases inherent in the M^5 mutation. Eventually the induced tetramolting larvae underwent the first, second, third, fourth and sixth instars. Neither N or R phases appear to be modified in the hitherto known genetic or artificial molting variants (Kawaguchi *et al.*, 1993, 1994, 1997). The presently reported change by KK-42 again seemed to take place via the I phase. It is likely that the physiological events in the N and R phases should be kept stable for the larval development and the role of I phase in genetic and artificial alteration of larval life span is of increasing interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (Nos. 10460026 and 08406006) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

REFERENCES

- AKAI H., MAUCHAMP B. (1989) Suppression effects of an imidazole derivative, KK-42 on JH levels in hemolymph of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 58, 73-74.
- ASANO S., KUWANO E., ETO M. (1984a) Anti-juvenile hormone activity of 1-citronellyl-5-phenylimidazole in the 3rd instar silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera; Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 19, 212-220.
- ASANO S., KUWANO E., ETO M. (1984b) Induction of precocious metamorphosis by dietary administration of 1-citronellyl-5-phenylimidazole in the 4th instar silkworm, *Bombyx mori* L. J. Pesticide Sci., 9, 503-509.
- ASANO S., KUWANO E., ETO M. (1986a) Anti-juvenile hormone activity of imidazole compounds (KK-22) and its diminution by methoprene in the 4th instar silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera; Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 21, 63-69.
- ASANO S., KUWANO E., ETO M. (1986b) Precocious metamorphosis induced by an anti-juvenile hormone compound applied to 3rd instar silkworm larvae, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera; Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 21, 305-312.
- BANNO Y., TOCHIHARA S., KAWAGUCHI Y., DOIRA H. (1993) Hemolymph proteins during larval development of *Bombyx mori*: "Proteins of young Larvae". J. Seric. Sci. Jpn., 62, 187-194.
- CHIKUSHI H. (1972) *Gene and Genetical Stocks of the Silkworm*. Keigaku, Tokyo, 1-288.
- DAVIS B. J. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: Pt. 2, 404-427.
- DOIRA H. (1983) Linkage map of *Bombyx mori*: status quo in 1983. Sericologia, 23, 245-269.
- DOIRA H. (1986) Linkage map of *Bombyx mori*: revised in 1986. Sericologia, 26, 485-488.
- FUJIWARA Y., YAMASHITA O. (1990) Purification, characterization and developmental changes in the titer of a new larval serum protein of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem., 20, 751-759.
- HAYASHI H. (1983) A filter paper technique for the microdetermination of protein. Seikagaku, 55, 257-258.
- KADONO-OKUDA K., KUWANO E., ETO M., YAMASHITA O. (1987a) Anti-ecdysteroid action of some imidazole derivatives on pupal-adult development of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera; Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 22, 370-379.
- KADONO-OKUDA K., KUWANO E., ETO M., YAMASHITA O. (1987b) Inhibitory action of an imidazole compound on ecdysone synthesis in prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. Develop. Growth and Differ., 29, 527-533.

- KAWAGUCHI Y., AKAGI S., BANNO Y., KOGA K., KUWANO E., DOIRA H. (1997) Protein profiles of larval haemolymph of *Bombyx mori* in artificially induced trimolting larvae using a 1,5-disubstituted imidazole. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 41, 203-209 (1997).
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H., FUJII H. (1994) Haemolymph protein profiles in allatectomy-induced trimolters resemble those of a recessive trimolting mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B, 579-584.
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H., FUJII H. (1993) Characteristic profiles of haemolymph proteins during larval development of molting mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B, 361-367.
- KAWAGUCHI Y., FUJII H., DOIRA H. (1983) Changes in haemolymph protein during larval development of the dimolting mutant in *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56, 517-523.
- KOBARA R. (1967) Sexual difference in haemolymph protein of several insects. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.*, 11, 71-75.
- KUWANO E., TAKEY R., ETO M. (1983) Terpenoid imidazoles: New anti-juvenile hormones. *Agric. Biol. Chem.* 47, 921-923.
- KUWANO E., TAKEYA R., ETO M. (1985) Synthesis and anti-juvenile hormones activity of 1-citronellyl-5-substituted imidazoles. *Agric. Biol. Chem.* 49, 483-486.
- KUWANO E., TAKEYA R., ETO M. (1986) Synthesis and anti-juvenile hormones activity of 1-citronellyl-5-[(E)-2,6-dimethyle-1,5-heptadienyl] imidazoles. *Agric. Biol. Chem.* 48, 3115-3119.
- KUWANO E., HISANO T., ETO M., SUZUKI K., G.C. UNNITHAN G.C., BOWERS S. (1992) Insect growth regulating activity of 1,5-disubstituted imidazoles against *Bombyx mori* and *Oncopeltus fasciatus*. *Pestic. Sci.*, 34, 263-268.
- NAKASONE S., KOBAYASHI M. (1965) Acrylamide gel electrophoresis of blood protein during the molting and the metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 34, 257-262.
- ORNSTEIN L. (1964) Disc electrophoresis I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121: Pt. 2, 321-349.
- SHIMAZU K., SHIMIZU M., SUZUKI K., KUWANO E. (1996) Precocious metamorphosis-inducing activity of 1-substituted imidazoles. *J. Pesticides Sci.*, 21, 337-339.
- TOJO S., NAGATA M., KOBAYASHI M. (1980) Storage proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 10, 47-53.
- YAMASHITA O., KADONO-OKUDA K., KUWANO E., ETO M. (1987) An imidazole compound as a potent antecdysteroid in an insect. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2295-2297.

TRAITS CARACTERISTIQUES DES PROTEINES DE L'HEMOLYMPHE LARVAIRE CHEZ UN MUTANT PENTAMUANT DE *BOMBYX MORI* TRAITE PAR L'APPLICATION D'UN IMIDAZOLE DISUBSTITUE 1,5

K. KAWAGUCHI^{1*}, S. AKAGI¹, Y. BANNO¹ ; K. KOGA¹, E. KUWANO² AND H. DOIRA³

1 Laboratory of Sericultural Science,

2 Laboratory of Pesticide Chemistry and

3 Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-81, Japon.

*Les larves tétramantes artificielles sont obtenues par l'application d'un régulateur de croissance d'insectes, l'imidazole 1-benzyl-5[(E)-2,6-diméthyl-1,5-heptadienyl] (KK-42), chez un mutant pentamant M⁵ de *Bombyx mori* peu après la quatrième mue. Les quantités totales et les profils électrophorétiques des protéines de l'hémolymphe de ces larves tétramantes «restituées» au cinquième âge (final) sont similaires à celles du sixième âge (dernier) du M⁵ traitées par simulation et à celles du cinquième âge (dernier) du tétramant normal. On suggère que le KK-42 entraîne l'omission du cinquième âge, la phase intermédiaire dupliée propre au mutant M⁵.*

INTRODUCTION

La concentration et la constitution des protéines hémolympatiques chez le ver à soie domestiqué, *Bombyx mori*, changent sensiblement durant le développement larvaire (Nakasone et Kobayashi, 1965 ; Kobara, 1967). Sur la base des profils quantitatifs et qualitatifs des protéines de l'hémolymphe, nous avons proposé que le développement larvaire complet de *B. mori* soit divisé en trois phases : la phase de croissance nutritionnelle (N), la phase de croissance intermédiaire (I) et la phase de croissance reproductrice (R) (Kawaguchi et coll., 1993, 1994). La phase N va du premier au troisième âge, quand la concentration des protéines totales de l'hémolymphe est peu élevée et qu'il n'y a pas de différence sexuelle dans les diagrammes de bandes. Les protéines appelées PYLs-A et B (protéines de jeunes larves A et B) prédominent dans l'hémolymphe à cette phase (Fujiwara et Yamashita, 1990 ; Banno et coll., 1993). La phase I correspond au quatrième âge (I), qui semble montrer un temps de transition entre la phase N à la phase R. La concentration des protéines de l'hémolymphe est encore basse sans différence sexuelle. La phase R est le cinquième âge avec l'augmentation rapide de la concentration des protéines de l'hémolymphe globales. Ce phénomène est plus marqué chez la femelle que chez le mâle, principalement parce que la quantité du composant appelé SP-1 (protéine de stockage-1) ou FL (protéine femelle spécifique) augmente seulement chez la femelle (Tojo et coll., 1980 ; Kawaguchi et coll., 1983), bien que d'autres protéines y compris SP-2 (protéine de stockage-2) augmentent dans les deux sexes. FL peut servir de ressource dans la formation du vitellus et ainsi l'âge final est considéré comme une période où la croissance reproductrice a déjà lieu.

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

Le type normal de *B. mori* en ce qui concerne le voltinisme est le tétramuant (Chikushi, 1972), qui alterne cinq phases d'alimentation et quatre mues jusqu'au début du coconage suivi par le stade chrysalide (Kawaguchi et coll., 1993, 1994). Il existe des mutations qui modifient le nombre de mues, par exemple, un mutant pentamuant comprend six phases et cinq mues (Doira, 1983, 1986). Ce caractère est contrôlé par le gène M^5 , qui appartient au sixième groupe de liaison et est récessif par rapport au caractère normal tétramuant. Le nombre de mues larvaires peut être aussi modifié artificiellement par des composés anti-hormonaux tels que les dérivés d'imidazole (Asano et coll., 1984a, 1984b, 1986a, 1986b). En particulier, l'imidazole 1-benzyl-5-[(E)-2,6-diméthyl-1,5-heptadienyl] (KK-42) est efficace pour obtenir une larve trimuante à partir des races de *B. mori* normales et cela est interprété par l'activité anti-ecdystéroïde (Akai et Mauchamp, 1986 ; Kadono-Okuda et coll., 1987a, 1987b ; Kuwano et coll., 1983, 1985, 1986, 1992 ; Yamashita et coll., 1987 ; Shimazu et coll., 1994). Dans la présente étude, nous confirmons que le traitement avec KK-42 a restitué le tétramuant à partir de larves pentamuantes M^5 , et avons examiné les profils des protéines de l'hémolymphe aux âges larvaires avancés de la population M^5 ainsi traitée en comparaison de ceux des larves tétramuantes normales et du témoin ayant un simulacre de traitement.

MATERIELS ET METHODES

Souche de vers à soie :

La souche utilisée est la t201, une lignée stock de l'Institute of Genetics Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University. Elle possède le gène M^5 à 24 cM du sixième groupe de liaison (6-24.1), le gène E^{EI} (croissants et pattes surnuméraires) (6-21.1) comme marqueurs génétiques et $T(W;3)Ze$ (le gène zébré dominant limité au sexe déplacé sur le chromosome W) comme marqueurs sexuels (Doira, 1983, 1986) ; ainsi les femelles (Ze) et les mâles ($+^{Ze}$) peuvent être distingués au stade larvaire. Cette lignée a été maintenue par le croisement $T(W;3)Ze : E^{EI}+/+M^5$ femelle X $M^5/+M^5$ mâle. Dans la génération suivante, les hétérozygotes E^{EI} avec des croissants et des pattes surnuméraires et les homozygotes $+^{EI}$ avec des taches normales et des pattes normales sont séparés dans un rapport de 1 : 1 à l'intérieur des mêmes lots. Les premiers sont des larves normales (tétramuantes) et les seconds sont des larves M^5 (pentamuantes) avec le même niveau de base génétique. Les deux sortes de larves sont élevées sur des feuilles de mûriers à 25°C et recueillies pour les expériences suivantes.

Traitement des larves avec KK-42 :

Le KK-42 dissout dans l'acétone (0,1 %, p/v) est appliqué (50 µg par larve) peu après la quatrième mue de manière topique sur le tégument dorsal des larves pentamuantes (M^5) ségréguées. A cette dose, les larves traitées sont entièrement transformées en tétramuantes. Les larves témoins recevant le solvant seul restent toutes pentamuantes.

Préparation des échantillons d'hémolymphe :

Les spécimens d'hémolymphe de larves traitées au KK-42 sont recueillis à 24 heures d'intervalles du jour 0 (peu après l'ecdysis) du cinquième âge au début du filage. Les spécimens témoins sont recueillis à partir des larves pentamuantes (M^5) traitées à l'acétone (à partir du jour 0 du cinquième âge au jour 5 du sixième âge) et à partir des larves tétramuantes normales (du jour 0 du quatrième âge au jour 5 du cinquième âge). Tous sont centrifugés pour enlever les hémocytes comme détaillé précédemment (Kawaguchi et coll., 1993) et les surnageants sont utilisés pour les analyses de protéines comme décrit ci-dessous.

Analyses quantitatives et qualitatives des protéines :

Les surnageants sont traités avec de l'acide trichloracétique (TCA, 5 % final) à 5°C et les précipités sont lavés trois fois avec du TCA glacé et avec de l'éthanol : éther (1 : 1) pour enlever les

acides aminés libres et les lipides, puis dissouts dans 0,1 N NaOH. La solution est mesurée pour la concentration totale de protéines par la méthode de Folin utilisant des bouts de papier filtre avec de la sérum albumine bovine comme standard (Hayashi, 1983). Les supernageants sont soumis à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Davis, 1964 ; Ornstein, 1964) utilisant un gel de séparation à 6,5 % comme détaillé précédemment (Kawaguchi et coll., 1993). Les bandes de protéines sont visualisées par coloration au Bleu de Coomassie (Brilliant Blue R-250) à 0,1 % dans l'éthanol : acide acétique : eau distillée (4 : 1 : 5) pendant 1 h et décolorés dans l'acide acétique à 7 %.

RESULTATS

Changements dans la concentration des protéines hémolympathiques :

Dans les larves normales (+^M) tétramantes (*E^{FL}* avec les croissants et les pattes surnuméraires), la concentration totale de protéines hémolympathiques est peu élevée pendant le quatrième âge, avec une petite différence entre les sexes (Fig. 1A). Au cinquième âge (dernier), la concentration augmente rapidement ; les valeurs sont plus élevées chez la femelle que chez le mâle. Les larves pentamantes *M^S* (+^E avec les taches et les pattes normales) donnent des valeurs peu élevées de concentration en protéines hémolympathiques au cinquième âge dans les deux sexes (Fig. B). Cette caractéristique ressemble à celle du quatrième âge chez le tétramant normal (non montré). Au sixième âge (dernier) de *M^S*, la concentration augmente rapidement avec une différence sexuelle évidente, comme le cinquième âge (dernier) du tétramant normal. Ces résultats sont la confirmation de nos données précédentes (Kawaguchi et coll., 1993). Par ailleurs, il a été découvert que les larves tétramantes provoquées par le KK-42 à partir de larves *M^S* ont un cinquième âge (dernier) prolongé (6 jours au lieu de 4 jours normalement) ; les larves commencent à filer les cocons le jour 7 et deviennent à temps des «chrysalides *M^S* précoces». Le profil de concentration de protéines dans ce tétramant provoqué (Fig. 1C) est presque le même que celui du tétramant normal au cinquième âge et que celui de la souche mutante *M^S* au sixième âge.

Changements dans la composition des protéines hémolympathiques :

L'analyse électrophorétique des spécimens d'hémolymphe à partir des larves tétramantes normales au cinquième âge (Fig. 2A) révèle que les bandes de protéines FL, SP-2 et les autres y compris celles numérotées de 1 à 7 ont une faible intensité les jours 0 et 1, puis croissante après le deuxième jour chez les deux sexes. A ce jour et même après, la bande FL est plus marquée chez la femelle que chez le mâle, dans lequel cette bande demeure faible. Chez les larves du pentamant (*M^S*), les bandes de protéines sont faibles et n'affichent aucune différence entre les deux sexes au cinquième âge (Fig. 2B). Néanmoins au sixième âge, le profil ressemble à celui du cinquième âge du tétramant normal. Les résultats globaux sont encore conformes aux précédentes conclusions présentées (Kawaguchi et coll., 1993). Par ailleurs, les larves tétramantes provoquées (*M^S* traitées au KK-42) donnent un profil avec un dimorphisme sexuel net de la bande FL au cinquième âge (dernier) (Fig. 2C). On sait que cette situation ressemble beaucoup à celle du cinquième âge du tétramant normal et à celle du sixième âge de *M^S*.

DISCUSSION

Les résultats ci-dessus confirment que le traitement des larves pentamantes (*M^S*) avec le régulateur de croissance d'insectes KK-42 produit des larves tétramantes comme les larves normales. Nous interprétons cela comme un "sauvetage" de la mutation pentamante. Les caractéristiques dans la concentration et la constitution des protéines de l'hémolymphe pendant les âges larvaires de ce tétramant sauvé sont résumées dans la figure 3, comparées à celles du tétramant normal et du *M^S* traité à blanc. Il faut remarquer que le mutant *M^S* comporte les phases I répétées (indiquées par le chiffre arabe 4 dans la figure 3) comme précisé précédemment (Kawaguchi et coll., 1993). Nous suggérons que le sauvetage est survenu en sautant le cinquième âge, une des deux phases I propres à

la mutation M⁵. En fin de compte, les larves tétramuentes provoquées subissent les premier, deuxième, troisième, quatrième et sixième âges. Ni la phase N ni la phase R ne semblent être modifiées chez les variants artificiels ou génétiques connus jusqu'ici (Kawaguchi et coll., 1993, 1994, 1997). Le changement précisé ci-dessus par le KK-42 semble se produire par la phase I. Il est probable que les événements physiologiques dans les phases N et R doivent rester stables pour le développement larvaire, et le rôle de la phase I dans la modification artificielle et génétique de la durée de vie larvaire est d'un intérêt croissant.

A NEW TRANSLUCENT GENE 'OF' OF THE SILKWORM

MENG ZHIQI¹, YUTAKA BANNO², HIROSHI DOIRA², LIU JING¹, H. B. WENG¹

1. Institute of Sericulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, 310021, P. R. China.

2. Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashiku, Fukuoka 812 Japan.

A new recessive gene denoted as 'of' was found in the silkworm. The phenotype of homozygous 'of' is translucent in larval skin. Using 'Lan' as a marker gene of the 21st linkage group, we were able to locate this recessive mutation on the 21st linkage group.

Keywords: Silkworm, recessive gene, linkage group.

INTRODUCTION

The skin of normal larva is opaque, because of the crystalloid of carbamide, but the hypoderm of translucent strain is transparent, because of lacking the protein that absorbs carbamide (T. Ito, 1984). Translucency is a special heritable character, providing good material for the study of cell genetics as well as biochemical genetics. A series of study have so far been carried out on the translucent mutants. About 40 genes have been known responsible for this character, all those genes located at 20 different loci in 15 linkage groups.

In spring culture of 1992, Doira obtained 4 exceptional translucent larvae from c20 strain, *of* which the skin was moderately transparent. These mutants were named o20 and assigned a gene symbol of 'of'. In autumn culture of 1992, using *Y*(2), *Ze*(3), *L*(4), *EL*(6), *q*(7), *C*(12), *U*(14), *bl*(15), *cts*(16), *bts*(17), *mw*(20), *Nd*(25), *so*(26), *E-tr*(?) as markers representing 14 linkage groups, he failed to find out any linkage relationship with those gene markers, i.e. 'of' was independent of all 14 linkage group. We undertook therefore to continue the work on 'of' and fortunately we were able to find out linkage relationship of this gene with *Lan* (lanky) that belongs to the 21st group. The outline of this work will be reported briefly in the following lines.

MATERIALS AND METHODS

The material strain we used as a marker representing the 21st linkage groups was *Lan*, which was reported in detail by Doira *et al.* in 1977. It shows slender body shape in heterozygous larvae and is accompanied by a significant prolongation of larval duration. But, homozygote is lethal in embryonic stage. The mutant was obtained originally as a radiation induced mutant and revealed to have a fairly long deletion in the 21st chromosome that covers *rb* locus on the homologous chromosome.

The methods used for searching the linkage relation was as usual, i.e. observation of distorted segregation ratio in the offspring.

RESULTS AND CONCLUSION

F₁ of the 'of' crossed to normal was normal in the skin colour, and segregation occurred in F₂ showing in the ratio of 3 normal:1 translucent, which was in good agreement with the expectation of Mendel's law of segregation (Table I), indicating that 'of' is recessive to the normal in its inheritance.

Next, we crossed 'of' with *Lan*. In F₁ segregation occurred in the ratio of 1 normal (both body shape and skin colour): 1 lanky translucent (Table II). Since *Lan* is maintained as heterozygote for deletion chromosome and its homologous normal chromosome, the genotype of the former segregants (normal) is assumed to be $+^{Lan} +^{of} / +^{Lan}$ and the latter (lanky and translucent) to be $- / +^{Lan} of$ although the segregation ratio deviated a little from 1:1 in the family No. 2.

When lanky translucent was bred inter se, about 1:4 of the deposited eggs did not hatch out (embryonic lethal) and segregation occurred among survived larvae in the ratio of 2 normal: 1 lanky

Table I. Segregation of phenotypes in the cross («of» translucent larva × normal larva)

Tableau I. Séparation des phénotypes dans le croisement («of» larve translucide × larves normale)

Family No.	Total number of larvae	Normal	Translucent
Numéro de famille.	Nombre total de larves	Normales	Translucides
1	442	329(74.43%)	113(25.56%)
2	488	361(73.97%)	127(26.02%)

Table II. The progeny of the cross (*Lan*/+)(*of*/*of*)

Tableau II. Descendance du croisement (*Lan*/+)(*of*/*of*)

Family No.	Total number of larvae	Normal	Lanky translucent	χ^2
Numéro de famille	Nombre total de larves	Normales	Lanky translucides	
1	263	127(48.30%)	136(51.70%)	
2	306	137(44.40%)	169(55.60%)	3.346*

* Represent $P=0.05$ significative level / * Représente $P=0,05$ niveau significatif

Table III. Phenotypes segregated in the self-bred progeny of Lanky translucent

Tableau III. Phénotypes dans la descendance inbred du Lanky translucide

Family No.	Total number of eggs	Lethal eggs	Normal larvae	Lanky translucent larvae
Numéro de famille	Nombre total d'œufs	Oeufs létaux	Larves normales	Larves Lanky translucides
1	91	24(26.40%)	43(47.30%)	24(26.30%)
2	87	22(25.30%)	44(50.60%)	21(24.10%)

translucent (Table III). The result was just as expected from the assumption that 'of' is located on the 21st chromosome occupying its locus on the normal chromosome, homologous to the deletion part of the *Lan* leaving chromosome.

In conclusion, 'of' is decided to be a new translucent gene that belongs to the 21st linkage group.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was financially supported by the National Natural Science Foundation of P. R. China (Grant No. 39670568) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of P.R. China (Grant No. 396252).

REFERENCES

- ITO T. (1984) Silkworm biochemistry. Shokato, Tokyo, Japan, 171-192.
 DOIRA HIROSHI, CHIKUSHI H., TSUJITA M & KIHASA H. (1977): Linkage studies on *Bombyx mori*; Discovery of a new linkage group *rh-Lan-Sl-v*. J. Sericult. Sci. Japan, 46, 521-527.
 DOIRA HIROSHI (1983): Linkage maps of *Bombyx mori*-Status quo in 1983. Sericologia, 23, 245-269.

UN NOUVEAU GENE TRANSLUCIDE «OF» CHEZ LE VER A SOIE

MENZ ZHIQI¹, YUTAKA BANNO², LIU JING¹, H.B. WENG¹

1. Institute of Sericulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, 310021, P.R. Chine.

2. Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashiku, Fukuoka 812 Japon.

Un nouveau gène récessif sous le nom de «of» a été découvert chez le ver à soie. Le phénotype de l'homozygote «of» est translucide pour la peau larvaire. Utilisant «Lan» comme gène marqueur du 21ème groupe de liaison, nous avons pu localiser cette mutation récessive sur le 21ème groupe de liaison.

INTRODUCTION

La peau de la larve normale est opaque à cause des cristalloïdes de carbamide, mais l'hypoderme de la race translucide est transparent, à cause de l'absence de la protéine qui absorbe la carbamide (T.Ito 1984). La transparence est un caractère héritable particulier, fournissant un bon matériel pour la génétique cellulaire ainsi que pour la génétique biochimique. Plusieurs études ont jusqu'ici été effectuées sur les mutants translucides. Environ 40 gènes sont tenus pour responsables de ce caractère, tous ces gènes sont localisés à 20 sites différents dans 15 groupes de liaison.

Au moment de la culture du printemps 1992, Doira a obtenu 4 larves translucides exceptionnelles à partir de la race C20, dont la peau était plus ou moins transparente. Ces mutants ont été appelés o20 et le symbole «of» du gène a été assigné. Lors de la culture d'automne 1992, utilisant *Y*(2), *Ze*(3), *L*(4), *EL*(6), *q*(7), *C*(12), *U*(14), *bl*(15), *cts*(16), *bts*(17), *mw*(20), *Nd*(25), *so*(26), *E-tr*(?) en tant que marqueurs représentant 14 groupes de liaison, il n'a pas été possible de découvrir une quelconque relation de liaison avec ces gènes marqueurs : en l'occurrence «of» est indépendant des 14 groupes de liaison. Par conséquent, nous avons entrepris de continuer le travail sur «of» et heureusement nous avons découvert une liaison entre ce gène et *Lan* (Lanky) qui appartient au 21ème groupe. Les grandes lignes de ce travail seront rapportées brièvement dans les lignes suivantes.

MATERIELS ET METHODES

Le matériel que nous avons utilisé comme marqueur représentant le 21ème groupe de liaison est *Lan*, lequel a été décrit en détail par Doira et coll. en 1977. *Lan* donne un corps mince chez une larve hétérozygote et est accompagné par une prolongation significative de la durée larvaire. Cependant, l'homozygote est léthal dans la phase embryonnaire. A l'origine, le mutant a été obtenu par irradiation et connu pour faire partie d'une large délétion sur le 21ème chromosome qui couvre le locus *rb* sur le chromosome homologue.

Les méthodes utilisées pour connaître la relation de liaison ont été les méthodes habituelles, c'est-à-dire l'observation du rapport de ségrégation déséquilibré dans la descendance.

RESULTATS ET CONCLUSION

La F₁ du «*of*» croisé avec un ver à soie est normale quant à la couleur de la peau, et le rapport de ségrégation en F₂ de 3 normaux : 1 translucide est en bonne adéquation avec la prévision de la loi de Mendel sur la ségrégation (Tableau I). Ce qui indique que «*of*» est récessif par rapport au "normal".

Ensuite, nous avons croisé «*of*» avec *Lan*. En F₁, la ségrégation s'est produite dans le rapport 1 normal (forme du corps et couleur de peau) : 1 translucide lanky (Tableau II). Puisque *Lan* est maintenu hétérozygote pour la délétion chromosomique et son chromosome normal homologue, le génotype des premiers ségréants (normal) est supposé être $+^{Lan} +^{of}/+^{Lan} of$, et le génotype des derniers ségréants (lanky et translucide) est supposé être $Lan - /+^{Lan} of$, bien que le rapport de ségrégation soit un peu différent de 1 : 1 dans la famille No.2.

Lorsque le translucide lanky est élevé inter se, environ $\frac{1}{4}$ des oeufs déposés n'ont pas éclos (léthal embryonnaire) et la ségrégation parmi les larves suivantes est dans un rapport de 2 normaux : 1 translucide lanky (Tableau III). Le résultat est celui attendu de l'hypothèse que «*of*» se trouve sur le 21^{ème} chromosome occupant son locus sur le chromosome normal, homologue à la partie délétée de *Lan* sur le chromosome restant.

En conclusion, nous décidons que «*of*» est un nouveau gène translucide qui appartient au 21^{ème} groupe de liaison.

STUDIES ON THE VARIABILITY IN THE DIFFERENT MORPHOVARIENTS OF ECORACE BHANDARA OF TASAR SILKWORM *ANTHERAEA MYLITTA D*

G.S.YADAV*, B.M.K. SINGH**, B.R.R.P. SINHA** AND S.S. SINHA**

Different morphovariants of ecorace Bhandara are known to exist in nature in wild form. The method of correlation and regression analysis, an application of advanced statistical methodology can be applied for morphometric studies to differentiate into different morphogenetic groups and to be clearly acquainted as different morphovariants or biotypes based on the different cocoon characters. By the use of regression coefficient as base, the different morphovariants can be distinguished into different stability groups. The morphovariants 'C' and 'M' have been found most widely adapted and the morphovariant Y indicates poor adaptability.

Keywords: Ecorace Bhandara, morphovariants, Mulki and Ranat.

INTRODUCTION

The ecorace Bhandara of *Antheraea mylitta D* is well distributed in the distinct belt of tropical moist deciduous mixed forest of Bhandara, Gadchiroli and Chandrapur districts of Maharashtra, India (18.71°N to 21.60°N and 78.78°E to 80.90°E) and adjoining areas of the above three districts. Different morphovariants of the race are known to exist in the nature. The colour of the cocoons in the same race differs varying from raw silk colour or cream (C), pale cream or light yellow (Y) and mushroom colour (M) and is therefore represented as various biotypes or morphovariants. These types are locally named as «mulki» which includes morpho-variants C and Y and Ranat which includes morphovariant Y&M. The length, breadth, L/B ratio, horizontal circumference, longitudinal circumference, longitudinal-horizontal circumference ratio and volume of the cocoons differs in its population having different colour in the population of the same place and place to place within the ecorace, therefore representing different morpho-variants or biotypes of morphotypes. The Ranat is considered to be best by tasar farmers with respect to fecundity and recovery of silk. Survey report reveals that the race is mainly restricted in tropical moist deciduous mixed forest types where rainfall varies between 1500 to 2000 mm and geographic range of population distribution is limited in two types of soil i.e., red loamy and black clayey (Sengupta *et al.*, 1993) based on texture wherein the deep black and rich soils are known as Kanhar and Moraud-I, forest soils as sehar with the pockets of Moraud-II and Hill soils as Khardi and Bardi (Patil and Sadar, 1976) owing to its wide range of distribution, the race has to encounter the diverse ecological conditions and as a consequence of conspicuous adaptation of different ecological niches the race has subdivided itself into different morpho-genetic groups.

In the present study, some morphometric characters have been taken for study because of their usefulness in identification of various morphogenetic groups (Pilay, 1952., James, 1967., Sultan and Shamsi, 1981., Shrivastava and Pandey, 1981., Yadav and Goswami 1991., Yadav and Goswami, 1992., Sengupta *et al.*, 1993).

* Regional Tasar Research Station, Bhandara 441-904 Maharashtra, India (author for correspondence)

** Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi 835-303, Bihar, India

Statistical models describing correlation and regression studies between cocoon length and cocoon breadth, horizontal and longitudinal circumference of the cocoons and horizontal x longitudinal circumference of the cocoons with volume of the cocoons have been used for the first time to separate different morphogenetic groups of ecorace Bhandara of tasar silkworm *A. mylitta* from each other. Thus, in the present investigation a detailed study has been made on three morpho-variants of ecorace Bhandara using advanced statistical methodology, with a view to showing the correct picture of the variations in the morpho-variants C, Y and M for their different correlating traits from each other.

MATERIALS AND METHODS

Cocoons of all types of ecorace Bhandara of tropical tasar silkworm were collected from the Bhandara (Maharashtra) India (Longitude 79.66°E, latitude 21.66°N). Three morpho-variants i.e., cocoons of raw silk colour (C), cocoons of pale cream (Y) and cocoons of mushroom colour (M) were used in this study from both the sexes. One hundred forty cocoons in seven replications in each sex of each morpho-variant of ecorace Bhandara were used for this study. Data on cocoon length, cocoon breadth, cocoon length - breadth ratio, horizontal circumference of the cocoons, longitudinal circumference of the cocoons, longitudinal - horizontal circumference ratio and volume of the cocoons were recorded for each morpho-variant for both the sexes. The data statistically analysed using 't' test, correlation coefficient, and regression equation of the independent and dependent variables under the study following the method of Gomez and Gomez (1984) and Palamichamy and Manoharan (1991) are presented in Table I to 4.

RESULTS AND DISCUSSION

The relevant results of the analysis for the 't' test, correlation coefficient (r), standard error of coefficient correlation (S.E. (r)), coefficient of determination (n), regression equation and per cent variation due to subject series and other factors are presented in Table I to 4.

Significant difference was observed in the cocoon length in both the sexes in different morpho-variants of ecorace Bhandara when compared with morpho-variant-C except morpho-variant-M (Female cocoons). Significant variation was noted in the cocoon breadth of morpho-variant-Y when compared with morpho-variant-C in both the sexes. There was no difference in the population of morphogenetic groups-C and M in the cocoon breadth in both the sexes (Table I).

All the three morphogenetic groups showed significant differences for cocoon length-breadth ratio, horizontal circumference of the cocoons, longitudinal circumference of the cocoons, longitudinal-horizontal circumference ratio and volume of the cocoons in the male population. There was no difference between the morpho-variant C and Y for length-breadth ratio, longitudinal circumference of the cocoons and volume of the cocoons in the female population (Table I).

If the various traits under comparison of the three morpho-variants having significant differences between the population are calculated in percentage, the data reveals that (13/14 traits) 92.85% traits in male and (9/14 traits) 64.28 p.c. traits in female differ significantly from each other. Thus, this type of comparison between different morpho-variant of ecorace Bhandara gives an exact picture of morphological differentiation into different morphogenetic groups.

A significant positive correlation was recorded between cocoon length and cocoon breadth of type C in both the sexes, type Y in male and type M in female whereas an insignificant positive correlation was noticed in types Y in female and M in male (Table II).

The regression equation of Y (cocoon breadth) on the X axis (cocoon length) drawn separately for all the types provides an exact differentiation among the different types of population involved. In type C the variation in the relative series (cocoon breadth) to an extent of 71.52 per cent (male)

Table I. Showing variability in the different morphovariants of ecorace Bandhara of tasar silkworm *A. mylitta* D [mean $\pm$ S.E.]

Tableau I. Variabilité des divers variants morphologiques de la race écologique Bhandara du ver à soie tasar *A. mylitta* D [moyenne $\pm$ S.E.]

Sex	Morpho-variants	Characters						
		Cocoon length (cm)	Cocoon breadth (cm)	Cocoon length/breadth ratio	Horizontal Circumference of the cocoons (cm)	Longitudinal circumference of the cocoons (c.m.)	Longitudinal / Horizontal circumference ratio	Volume of the cocoon (mm)
Caractères								
Sexe	Variants morphologiques	Longueur du cocon (cm)	Largeur du cocon (cm)	Rapport longueur / largeur du cocon	Circonférence horizontale des cocons (cm)	Circonférence longitudinale des cocons (cm)	Rapport circonf. longitudinale / horizontale	Volume du cocon (mm).
Male Mâle	C (Raw silk colour)	3.7242 ±0.0006	2.3857 ±0.0057	1.5571 ±0.0018	7.4428 ±0.0096	9.7728 ±0.0064	1.3124 ±0.009	0.7454 ±0.0019
	Y (Pale cream colour)	3.8585*** ±0.0026	2.3985* ±0.0040	1.6042*** ±0.0020	7.5457** ±0.0187	10.0214*** ±0.0083	1.3284*** ±0.0025	0.7647** ±0.0030
	M (Mushroom colour)	3.5985*** 0.0040	2.3867NS ±0.0057	1.5642* ±0.0020	7.2942*** ±0.0094	9.5371*** ±0.0085	1.3071** ±0.0008	0.6941** ±0.0024
	Couleur de champignon							
	C (Raw Silk colour)	4.3828 ±0.006	2.7514 ±0.0063	1.5871 ±0.0018	8.7357 ±0.0152	11.5057 ±0.0195	1.3167 ±0.0007	1.2030 ±0.0060
Female Femelle	Y (Pale cream colour)	4.4414*** ±0.0045	2.7900** ±0.0053	1.5857NS ±0.0020	8.6214** ±0.140	11.4900NS ±0.0117	1.3321*** ±0.0008	1.2041NS ±0.0088
	M (Mushroom colour)	4.3900NS ± 0.0081	2.6971NS ± 0.0086	1.6242*** ± 0.0029	9.0157*** ± 0.0117	11.7748*** ± 0.0152	1.3055*** ± 0.0011	1.2308* ±0.0056
	(Couleur de champignon)							

*: Significant at 5% level / Significatif au seuil de 5% **: Significant at 1% level / Significatif au seuil de 1% ***: Significant at 0.1% level / Significatif au seuil de 0.1% NS: Not significant / Non significatif.

Note: Test of significance has been compared considering morphovariant C as control (df=6) in both the sexes / Le test de signification a été comparé en prenant le variant morphologique C comme témoin (df = 6) dans les deux sexes.

remaining 28.48 per cent variation in male and 29.43 per cent variation in female may be due to other and 70.57 per cent (female) were recorded due to variation in the subject series (cocoon length) and factors. Likewise, in types Y and M the variations recorded due to subject series were 58.11 per cent in male 56.79 per cent in female and 55.17 per cent in male and 65.93 per cent in female respectively. It is, thus clear that poor variations due to subject series recorded in type Y (female) and type M (male) were due to an insignificant correlation between cocoon length and cocoon breadth. The significant and insignificant correlations between cocoon length and cocoon breadth within the sex of different types in the ecorace Bhandara differentiate into different groups. If insignificant differences are found, it can be concluded that two groups are alike and they have the same rate of variation between the cocoon length and breadth (Table 2).

Table II. Correlation and regression between cocoon length (X) and cocoon breadth (Y) in different morphovariants of ecorace Bhandara of *A. mylitta*.

*Tableau II. Corrélation et régression entre la longueur du cocon (X) et la largeur du cocon (Y) dans les divers variants morphologiques de la race écologique Bhandara de *A. mylitta*.*

Statistics	Morphovariant C		Morphovariant Y		Morphovariant M	
	Raw Silk Colour Male	Female	Pale cream colour Male	Female	Mushroom colour Male	Female
	Variant morphologique C		Variant morphologique Y		Variant morphologique M	
Statistiques	Couleur de soie grège Mâle	Femelle	Couleur crème pâle Mâle	Femelle	Couleur champignon Mâle	Femelle
1.	+0.8457*	+0.8401*	+0.7623*	+0.7536NS	+0.7428NS	0.8122*
2.	0.0726	0.0750	0.1068	0.1101	0.1097	0.0867
3.	0.7152	0.7057	0.5811	0.5679	0.5517	0.6597
4.	Y=-0.3980+ 0.7467X	Y=-1.0906+ 0.8768X	Y=-1.7357+ 1.0717X	Y=-1.1090+ 0.8781X	Y=-0.0775+ 0.6595X	Y=-1.0736+ 0.8573X
5.	71.52	70.57	58.11	56.79	55.17	65.97
6.	28.48	29.43	41.89	43.21	44.83	34.03

1. Correlation coefficient between cocoon length and cocoon breadth (r) / Coefficient de corrélation entre la longueur et la largeur du cocon (r).

2. Standard Error (SE) (r) / Ecart type (SE) (r)

3. Correlation of determination (n) / Corrélation de détermination (n).

4. Regression equation between cocoon length (X) and cocoon breadth (Y) / Equation de régression entre la longueur (X) et la largeur (Y) du cocon.

5. Variation due to subject series (%) / Variation due aux séries (%).

6. Variation due to other factors (%) / Variation due à d'autres facteurs (%)

NS. Non significant / Non significatif.

*: Significant at 5% level. (df=5) / Significatif au seuil de 5%. (dl = 5)

The correlation between the horizontal circumference of the cocoons and longitudinal circumference of the cocoons in the morphovariant 'C' in both the sexes, morphovariant 'Y' in the female and morphovariant 'M' in the male was significant at 5 per cent level ($df=5$). On contrary, both the variables in morphovariant Y (male) and morphovariant M (female) showed an insignificant positive correlation (Table) and thus the variation in the relative series due to subject series were 41.42 per cent respectively.

The prediction equation of Y (longitudinal circumference of the cocoons) on the X axis (horizontal circumference of the cocoons) drawn separately for all types of ecorace Bhandara, provides an exact differentiation of the population involved in both the sexes (Table III). The Y intercept which is found from the point at which the regression line cuts the Y axis differs in all the morphovariants in both the sexes. The slope of the regression line which is the ratio of the rise to run, for any run and steeper the line greater the slope (Paul Herzberg 1983).

Table III. Correlation and regression between horizontal circumference (X) and longitudinal circumference (Y) of the cocoons in different morpho-variants of ecorace Bhandara of *A. mylitta*.

*Tableau III. Corrélation et régression entre la circonférence horizontale (X) et la circonférence longitudinale (Y) des cocons chez divers variants morphologiques de la race écologique Bhandara de *A. mylitta*.*

Statistics	Morphovariant C		Morphovariant Y		Morphovariant M	
	Raw Silk Colour Male	Female	Pale cream colour Male	Female	Mushroom colour Male	Female
Statistiques	Variant morphologique Couleur de soie grège C		Variant morphologique Couleur crème pâle Y		Variant morphologique Couleur champignon M	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
1.	+0.8018*	+0.8086*	+0.6404NS	+0.8570*	+0.8308*	+0.6436NS
2.	0.0874	0.0882	0.1504	0.0677	0.0789	0.1493
3.	0.6428	0.6538	0.4101	0.7344	0.6902	0.4142
4.	Y=5.8086+	Y=2.4616+	Y=7.8685+	Y=5.3173+	Y=2.7226+	Y=4.2315+
	0.5324X	1.0354X	0.2853X	0.7161X	0.9338X	0.8367X
5.	64.28	65.38	41.01	73.44	69.02	41.42
6.	35.72	34.62	58.99	26.56	30.98	58.58

1. Correlation coefficient between horizontal circumference and longitudinal circumference of the cocoons (r) / Coefficient de corrélation entre la circonférence horizontale et la circonférence longitudinale des cocons (r).

2. Standard Error (SE (r)) / Ecart type (SR (r))

3. Correlation of determination (n) / Corrélation de détermination (n).

4. Regression equation between horizontal circumference (X) and longitudinal circumference (Y) of the cocoons / Equation de régression entre la circonférence horizontale (X) et la circonférence longitudinale (Y) des cocons.

5. Variation due to subject series (%) / Variation due aux séries d'étude (%).

6. Variation due to other factors (%) / Variation due à d'autres facteurs (%).

NS. Non significant / non significatif. * Significant at 5% level ($df=5$) / Significatif au seuil de 5% ($df=5$).

Table IV. Correlation and regression between horizontal circumference $\times$ longitudinal circumference of the cocoons (cm^2) and volume of the cocoons (mm).Tableau IV. Corrélation et régression entre la circonférence horizontale $\times$ la circonférence longitudinale des cocons (cm^2) et le volume des cocons (mm).

Statistics	Morphovariant Raw Silk Colour		Morphovariant Pale cream colour		Morphovariant Mushroom colour	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Statistiques	Variant morphologique Couleur de soie grège		Variant morphologique Couleur crème pâle		Variant morphologique Couleur champignon	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
	C		Y		M	
1.	+0.6373NS	+0.8975*	+0.7879*	+0.8004*	+0.7465NS	+0.8385*
2.	0.1514	0.0495	0.0966	0.0916	0.1128	0.0757
3.	0.4061	0.8055	0.6207	0.6406	0.5572	0.7030
4.	Y=0.1098+	Y=-0.3951+	Y=-0.0732+	Y=1.3333+	Y=-0.0066+	Y=-0.7118+
	0.0087X	0.0159X	0.01107X	0.0256X	0.01007X	0.0183X
5.	40.61	80.55	62.07	64.06	55.72	70.30
6.	59.39	19.45	37.93	35.94	44.28	29.70

1. Correlation coefficient between horizontal circumference X and longitudinal circumference of the cocoons (cm^2) and volume of the cocoons (r) / Coefficient de corrélation entre la circonférence horizontale X et la circonférence longitudinale des cocons (cm^2) et le volume des cocons (r).

2. Standard Error (SE (r)) / Ecart type (SR (r))

3. Correlation of determination (n) / Corrélation de détermination (n).

4. Regression equation between horizontal $\times$ longitudinal circumference (cm^2) of the cocoons (X) and volume of the cocoons (Y) / Equation de régression entre la circonférence horizontale $\times$ longitudinale (cm^2) des cocons (X) et le volume des cocons (Y).

5. Variation due to subject series (%) / Variation due aux séries d'études.

6. Variation due to other factors (%) / Variation due à d'autres facteurs (%)

NS: Non significant (df=5) / non significatif (df=5).

*: Significant at 5% level (df=5) / Significatif à un seuil de 5% (df=5).

The slope is the regression coefficient of the variables and Y intercept is the regression constant between the variables (Table III). The variation in the Y axis due to X series was maximum in the morphovariant Y (female) and minimum in the morphovariant Y (male).

The regression of the Y (cocoon's volume) on the X axis (horizontal circumference $\times$ longitudinal circumference of the cocoons) indicated that regression function has Y intercept in the negative form in the population of morphovariant C (female), Y (male) and M (female) as well as M (male) and a positive Y intercept in the morphovariant C (male), morphovariant Y (female). In total 66.67 per cent of the population in the different morphovariant adduced negative Y intercept and remaining population showed positive Y interception on Y axis (Table IV). All the population indicated a significant linear correlation between the variables except in morphovariant C (male) and morphovariant M (male) wherein the association between the variables was insignificant (Table IV).

The predicted variation was comparatively better in the females of all the morphovariants as and against the prediction variables of the male (Table IV).

The performance of a genotype mainly depends on the environmental interaction. However, in many cases a linear relationship is found between the performance of genotypes and the environmental conditions. Estimation of the phenotypic stability, which involves the regression analysis can also be analysed in the different morphovariants as regression analysis, has proved to be a valuable technique in the assessment of this linear relationship between the responses of genotypes and environmental changes (Singh, 1993). Regression coefficient of the unity indicates average stability, greater than one means below average stability and less than one means the genotype has a greater resistance to the environmental changes and possess average stability (Singh, 1993). However, in deciding about the worth of a genotype its mean performance must be considered along with its phenotypic stability. Otherwise, a variety which is the lowest yielding in all the environments will necessary show a 'b' value (regression coefficient) less than one. Generally a variant having $b=1$ and high mean (Table 3) would be considered as most widely adapted as possessed by morphovariant C (female) and morphovariant M (male). The distribution of morphovariant C in the district Bhandara and near by areas (which is locally known as Mulki) and distribution and adaptation of morphovariant M in the Waraseoni areas of the Balaghat district of Madhya Pradesh and adjoining areas (which is locally known as Ranat) in the wild form supports the above findings of the adaptability of the morphovariants. A 'b' value of one and low mean yield (over the environments) would indicate a poorly adapted population (Table III).

Eberhart and Russel (1996) defined the stability of variety based on the slope of the regression line and deviation from the regression line. They defined a stable variety as one with a regression coefficient of unity ($b=1$) and a minimum deviation from the regression line ($S_d^2=0$). Using this definition a breeder would usually desire to develop a variety that has mean yield and meets the above requirements for stability.

The aim of the natural selection is to confer adaptive capacity on the individuals selected. Therefore, it selects for fitness in terms of high productivity of the traits under selection (Sharma, 1994). Adaptation to different environments or different ways of adaptation into the same environment is consummated by the natural selection. The best adapted form is close to the average in all the metric traits (Fisher, 1930; Wright, 1951).

Variant adaptation consists of, on the other hand, the biochemical versatility or diversity conferring an additional ability on an organism to control and regulate the synthesis of an array of characteristic proteins and other substances responsible for bringing about modification in the phenotypes (Sharma, 1994).

The phenotypic flexibility is however complementary to genetic flexibility because a phenotypically flexible group of genotypes may be able to meet the challenges of the environment only when they are endowed with the requisite genetic flexibility i.e. the capacity of the genotypes to vary on changes in conditions (Thoday, 1955).

Therefore, it must be realised that quite a lot of differences are noticed in the characteristics of the different types of ecorace Bhandara. When the morphology of the cocoons are compared for various traits, it shows significant differences either in the cocoon length or in the cocoon breadth, cocoon length-breadth ratio, horizontal circumference of the cocoons, longitudinal-horizontal circumference ratio and volume of the cocoons in the different morphovariants of the ecorace Bhandara of tropical tasar silkworm to differentiate into different groups. If insignificant differences are found it can be concluded that two groups are alike and they have the same rate of variations between the traits under comparison (Yadav and Goswami, 1992).

The correlation coefficient (r) and regression analysis on the other hand deals with the relation between cocoon length and cocoon breadth, horizontal circumference of the cocoons, horizontal x longitudinal circumference and volume of the cocoons rendering a very useful comparative analysis to distinguish between different morphovariants of morphotypes or biotypes.

Thus, applying this morphometric analysis and using advanced statistical methodology different types of ecorace Bhandara could be differentiated into different morphogenetic groups and to be clearly acquainted as different morphotypes or biotypes which were not truly identified and distinguished before.

REFERENCES

- EBERHART S.A., RUSSEL W.A. (1966) Stability parameters for comparing varieties, *Crop Sci.* 6, 36-40.
- FISHER R.A. (1930) The genetical theory of natural selection. O.U.P. London.
- GOMEZ K.A., Gomez A.A. (1984) Statistical procedures for agricultural research, Second Edition, John Wiley and Sons, New York.
- JAMES P.S.B.R. (1967) The ribbon fishes of the family Trichuridae of India. *Mem. Mar. Biol.*, 1, 1-266.
- PALANICHAMY S., MANOHARAN, M. (1990) Statistical methods for biologist, Palani Paramount Publications 69 D, Anna nagar Palani, Tamil Nadu, India.
- PATIL N.R., SARDAR M.G. (1976) Working Plan, Bhandara Forest Div. Vol. I Bhandara (Maharashtra), India, year 1976-77 to 1995-96.
- PAUL, A. HERZBERG (1983) Principles of Statistics, John Wiley & Sons, New York.
- PILLAY T.V.R. (1952) A preliminary biometric study of certain population of hilsa, *Hilsa ilisha* (Ham). *Proc. Indo. Pacific Fish Comm.*, 4, 181-194.
- SENGUPTA A.K., SINHA AGIT KUMAR., SENGUPTA K. (1993) Genetic reserves of *Antheraea mylitta* Drury, *Indian Silk*, 32(5), 39-46.
- SHARMA J.R. (1994) Principles and Practice of Plant Breeding, Tata Mc Graw - Hill Publishing Company limited, New Dehli, India.
- SHRIVASTAVA S., PANDEY A.K. (1981) Growth rate of different body parameters in catla catla, *Geobios*, 8, 39-40.
- SINGH B.D. (1993) Plant Breeding Principles and methods (5th Edition) Kalyani Publishers, New Dehli, India.
- SULTAN S., SHAMSI M.J.K. (1981) Morphometric study of *Puntius Sarana* (Ham) of the river koli, *Geobios*, 8, 17-21.
- THODAY J.M. (1955) Balance, heterozygosity and developmental stability, *CSH Symp. Quant. Biol.* 20, 318-326.
- WRIGHT S. (1951) The genetical structure of population, *Ann. Eug.* 15, 323-356.
- YADAV G.S., GOSWAMI B.C. (1991) Studies on genetic variability in different morphotypes of Som (*Machilus bombycina*), *J. Ecobiol.*, 3(2), 147-151.
- YADAV, G.S. GOSWAMI B.C. (1992) Correlation and regression studies between leaf length and leaf length breadth ratio in different morphotypes of Som (*Machilus bombycina* king), *Sericologia*, 32 (2) 287 - 291.

ETUDES SUR LA VARIABILITE CHEZ DIFFERENTS TYPES MORPHOLOGIQUES DE L'ECORACE BHANDARA DU VER A SOIE TASAR *ANTHEREA MILITTA* D

G. S. YADAV*, B. M. K. SINGH **, B. R. R. P. SINHA S. S. SINHA**

On connaît l'existence de différents variants morphologiques de l'écorace Bhandara dans la nature à l'état sauvage. La méthode de corrélation et d'analyse de régression, dérivée d'une méthodologie statistique élaborée, peut être employée pour des études morphométriques permettant de différencier des groupes morphogénétiques différents afin qu'ils soient clairement connus comme des biotypes différents, à partir des différents caractères du cocon. En utilisant le coefficient de régression comme base, les différents variants morphologiques peuvent être divisés en des groupes de stabilité différents. Les variants morphologiques 'C' et 'M' sont plus largement adaptés et le variant morphologique Y est faiblement adapté.

INTRODUCTION

L'écorace Bhandara d'*Antheraea mylitta* D est bien distribuée dans la ceinture tropicale humide de forêt caduque mixte du Bhandara des districts de Gadchiroli et de Chandrapur du Maharashtra, Inde ($18,71^{\circ}\text{N}$ à $21,60^{\circ}\text{N}$ et $78,78^{\circ}\text{E}$ à $80,90^{\circ}\text{E}$) et dans les zones adjacentes à ces trois districts. On sait qu'il existe différents variants morphologiques dans la nature. La couleur des cocons chez cette race diffère, allant de la couleur de la soie grège ou crème (C), au crème pâle ou jaune clair (Y) et à la couleur de champignon (M) et elle se présente donc sous la forme de biotypes ou de morphovariants différents. Ces types sont localement connus sous le nom de « mulki », comprenant les variants morphologiques C et Y et de « Ranat », comprenant les morphovariants Y et M. La longueur, la largeur, le rapport longueur/largeur, les circonférences horizontale et longitudinale, le rapport des circonférence et le volume des cocons diffèrent pour les populations de couleurs différentes, dans la population du même endroit et d'endroits variés à l'intérieur de l'écorace, ce qui représente différents variants morphologiques ou biotypes de morphotypes. Le « Ranat » est considéré comme le meilleur par les exploitants du tasar par rapport à la fécondité et à l'obtention de soie. Un rapport d'enquête révèle que la race se limite aux forêts caduques mixtes de type tropical humide où les précipitations varient entre 1500 à 2000 mm ; la distribution de la population dans les zones géographiques est limitée à deux types de sol, l'argile rouge et noire (Sengupta et coll., 1993), en fonction de leur texture, les sols profonds, riches et noirs étant connus sous le nom de Kanhar et Moraud-I, les sols forestiers sous le nom de Sehar avec des poches de sols Moraud-II et Hill connus sous le nom de Khardi et Bardi (Patil et Sadar, 1976). En raison de sa distribution étendue, la race rencontre diverses conditions écologiques et en conséquence de son adaptation évidente à différentes niches écologiques elle s'est subdivisée en différents groupes morpho-génétiques.

* Regional Tasar Research Station, Bhandara 441-904 Maharashtra, Inde (auteur auquel la correspondance doit être adressée)

** Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi 835-303, Bihar, Inde.

Dans l'étude présente, certains caractères morphométriques ont été étudiés parce qu'ils sont utiles pour identifier divers groupes morphogénétiques (Pilay, 1952, James 1967, Sulan et Shamsi 1981, Shrivastava et Pandey 1981, Yadav et Goswami 1991, Yadav et Goswami, 1992, Sengupt et coll., 1993).

Les modèles statistiques décrivant la corrélation et les études de régression entre la longueur du cocon et la largeur du cocon, la circonférence horizontale et longitudinale des cocons et la circonférence horizontale $\times$ longitudinale avec le volume des cocons ont été utilisés pour la première fois pour classer les différents groupes morphogénétiques de l'écorace Bhandara du ver à soie *A. mylitta*. Ainsi, dans cette recherche une étude détaillée a été entreprise sur trois morphovariants de l'écorace Bhandara en utilisant une méthodologie statistique sophistiquée, dans l'objectif de montrer une image exacte des variations morphologiques C, Y et M pour leurs différents traits en corrélation.

MATERIELS ET METHODES

Les cocons de tous les types de l'écorace Bhandara du ver à soie tasar tropical ont été recueillis à Bhandara (Maharashtra) Inde (longitude 79,66°E, latitude 21,66°N). Trois morphovariants : les cocons de couleur de soie grège (C), les cocons crème pâle (Y), et les cocons de couleur champignon (M) ont été utilisés pour cette étude chez les deux sexes. Cent quarante cocons dans sept répétitions pour chaque sexe de chaque morphovariant de l'écorace Bhandara ont été utilisés pour cette étude. Les données sur la longueur du cocon, la largeur du cocon, le rapport longueur / largeur du cocon, la circonférence horizontale et la circonférence longitudinale des cocons, le rapport circonférence longitudinale / horizontale et le volume des cocons ont été enregistrées pour chaque morphovariant et pour les deux sexes. Les données analysées de manière statistique par le test 't', le coefficient de corrélation et l'équation de régression des variables indépendantes et dépendantes en suivant la méthode de Gomez et Gomez (1984) et Palamichamy et Manoharan (1991) sont présentées dans les tableaux I à IV.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats correspondants de l'analyse par le test 't', le coefficient de corrélation (r), l'écart type du coefficient de corrélation (S. E. (r)), le coefficient de détermination (n), l'équation de régression et le pourcentage de variation dus aux séries d'études et à d'autres facteurs sont présentés dans les tableaux I à IV.

On observe une différence significative concernant la longueur du cocon chez les deux sexes pour différents morphovariants de l'écorace Bhandara quand elles sont comparées au morphovariant C excepté chez le morphovariant M (cocons femelles). On note une variation significative de la largeur du cocon du variant Y par rapport à C pour les deux sexes. Il n'y a pas de différence pour la population des groupes C et M concernant la largeur du cocon des deux sexes (Tableau I).

Les trois groupes morphogénétiques présentent des différences significatives en ce qui concerne le rapport longueur/largeur du cocon, la circonférence horizontale des cocons, la circonférence longitudinale des cocons, le rapport circonférence longitudinale/horizontale et le volume des cocons pour ce qui est de la population mâle. Il n'y a pas de différence pour la population des groupes morphogénétiques C et M concernant la largeur des cocons pour les deux sexes. (Tableau I).

Si l'on calcule en pourcentage les différents traits comparés des trois morphovariants pour la population présentant des différences significatives, les données révèlent que (13/14 traits) 92,85 % des caractères du mâle et (9/14 traits), 64,28 % des caractères des femelles diffèrent entre eux de manière significative. Ainsi, ce type de comparaison entre différents variants morphologiques de l'écorace Bhandara donnent une image exacte de la différenciation morphologique entre les différents groupes morphogénétiques.

Une corrélation positive significative a été enregistrée entre la longueur du cocon et la largeur du cocon du type C pour les deux sexes, chez le mâle du type Y et chez la femelle M tandis que l'on

remarque une corrélation positive insignifiante pour les types Y chez la femelle et chez le mâle M (Tableau II).

L'équation de régression de Y (largeur du cocon) sur l'axe X (longueur du cocon) calculée séparément pour tous les types fournit une différenciation exacte parmi les différents types de population concernés. Pour le type C on enregistre la variation des séries relatives (largeur du cocon) jusqu'à 71,52 pour cent (mâle) et 70,57 pour cent (femelle) à cause des variations des séries (longueur du cocon) et la variation restante de 28,48 % chez le mâle et de 29,43 % chez la femelle est peut-être due à d'autres facteurs. De même, pour les types Y et M les variations enregistrées dues aux séries sont respectivement de 58,11 pour cent chez le mâle, de 56,79 pour cent chez la femelle et de 55,17 pour cent chez le mâle et de 65,93 pour cent chez la femelle. Il est donc clair que les variations faibles dues aux séries d'étude enregistrées pour le type Y (femelle) et le type M (mâle) sont dues à une corrélation insignifiante entre la longueur du cocon et la largeur du cocon. Les corrélations significatives et non significatives entre la longueur du cocon et la largeur du cocon entre le sexe des différents types de l'écovace Bhandar se divisent en différents groupes. Si l'on trouve des différences non significatives, on peut conclure que deux groupes sont similaires et qu'ils ont le même taux de variation entre la longueur du cocon et la largeur (Tableau II).

La corrélation entre la circonférence horizontale des cocons et la circonférence longitudinale des cocons chez le morphovariant 'C' des deux sexes, chez 'Y' pour la femelle et chez 'M' pour le mâle est significative à un niveau de 5 % ($df = 5$). Par contre, les deux variables du morphovariant Y (mâle) et du morphovariant M (femelle) présentent une corrélation positive non significative (Tableaux) et ainsi la variation dans les séries relatives dues aux séries sujet sont de 41 et 42 % respectivement.

L'équation de prédiction de Y (circonférence longitudinale des cocons) sur l'axe X (circonférence horizontale des cocons) calculée séparément pour tous les types de l'écovace Bhandara, fournit une différenciation exacte de la population concernée pour les deux sexes (Tableau III). L'interception Y que l'on trouve au point où la droite de régression coupe l'axe Y diffère pour tous les morphovariants chez les deux sexes. La pente de la droite de régression est le rapport d'augmentation pour n'importe quelle opération et plus la ligne est inclinée plus la pente est grande (Paul Herzberg, 1983).

La pente est le coefficient de régression des variables et l'interception Y est la constante de régression entre les deux variables (Tableau III). La variation sur l'axe Y due aux séries X est maximale pour le morphovariant Y (femelle) et minimale pour le morphovariant Y (mâle).

La régression d'Y (volume du cocon) sur l'axe X (circonférence horizontale $\times$ circonférence longitudinale des cocons) indique que la fonction de régression a une interception Y négative pour la population des morphovariants C (femelle), Y (mâle) et M (femelle) et également pour M (mâle) et une interception Y positive pour le morphovariant C (mâle) et le morphovariant Y (femelle). Au total 66,67 pour-cent de la population des différents variants morphologiques donnent une interception Y négative et la population restante présente une interception Y positive sur l'axe Y (Tableau IV). Toute la population indique une corrélation linéaire significative entre les variables excepté chez le morphovariant C (mâle) et le morphovariant M (mâle) où l'association entre les variables n'est pas significative (Tableau IV).

La variation prévue est comparativement meilleure chez les femelles de tous les variants morphologiques par rapport à la prédiction des variables des mâles (Tableau IV).

La performance d'un génotype dépend en grande partie de son interaction avec l'environnement. Dans de nombreux cas, on trouve une relation linéaire entre la performance des génotypes et les conditions agro-climatiques. L'estimation de la stabilité du phénotype qui implique une analyse de régression peut aussi être analysée chez les différents variants morphologiques par une analyse de régression, qui s'est révélée être une technique précieuse d'estimation de la relation linéaire entre les réponses des génotypes et les changements agroclimatiques (Singh, 1993). Un coefficient de régression de l'unité indique une stabilité moyenne, supérieur à un signifie au-dessous de la stabilité moyenne et inférieur à un signifie que le génotype a une résistance plus grande par rapport aux changements agro-climatiques et possède une stabilité moyenne (Singh, 1993). Cependant, pour décider de la valeur d'un génotype, il faut considérer sa performance moyenne et la stabilité de son

phénotype. Autrement, la variété dont le rendement est le plus faible dans tous les environnements présentera nécessairement une valeur 'b' (coefficient de régression) inférieure à un. En général, une variante ayant $b = 1$ et une moyenne élevée (Tableau III) est considérée comme la plus largement adaptée ce qui est le cas du morphovariant C (femelle) et du morphovariant M (mâle). La distribution de C dans la région de Bhandara et dans les zones limitrophes (connue localement sous le nom de Mulki) et la distribution et l'adaptation de M dans les zones de Waraseoni de la région de Balaghat du Madhya Pradesh et des zones limitrophes (connue localement sous le nom de Ranat) à l'état sauvage confirme les observations ci-dessus sur l'adaptabilité des variants morphologiques. Une valeur 'b' de un et un rendement moyen faible (par rapport aux environnements) indique une population faiblement adaptée (Tableau III).

Eberhart et Russel (1996) ont défini la stabilité d'une variété à partir de la pente de la droite de régression et de la déviation de la droite de régression. Ils ont défini une variété stable comme ayant un coefficient de régression unité ($b = 1$) et une déviation minimum de la droite de régression ($Sd^2 = 0$). L'utilisation de cette définition permettrait au sélectionneur d'obtenir une variété au rendement moyen satisfaisant aux critères ci-dessus en matière de stabilité.

Le but de la sélection naturelle est de conférer une capacité d'adaptation aux individus sélectionnés. Elle sélectionne donc les caractères présentant une forte productivité (Sharma, 1994). L'adaptation à des environnements différents ou divers modes d'adaptation au même environnement se fait par sélection naturelle. La forme la mieux adaptée est proche de la moyenne pour tous les traits quantitatifs (Fisher, 1930 ; Wright, 1951).

L'adaptation consiste, d'autre part, en la versatilité biochimique ou la diversité conférant une capacité supplémentaire d'un organisme à contrôler et réguler la synthèse d'un ensemble de protéines caractéristiques et d'autres substances provoquant la modification des phénotypes (Sharma, 1994).

La flexibilité du phénotype est cependant complémentaire de la flexibilité génétique parce qu'un groupe de génotypes au phénotype flexible est capable de répondre aux défis de l'environnement seulement quand ils sont dotés de la flexibilité génétique nécessaire, c'est à dire de la capacité des génotypes à faire face aux changements de conditions (Thoday, 1955).

Ainsi, on réalise qu'il existe de nombreuses différences pour les caractéristiques des différents types de l'écorace Bhandara. Quand on compare la morphologie des cocons par rapport à différents traits, elle présente des différences significatives que ce soit pour la longueur du cocon ou la largeur du cocon, le rapport longueur-largeur du cocon, la circonférence horizontale des cocons, le rapport de circonférence longitudinale/horizontale et le volume des cocons chez les différents variants morphologiques de l'écorace Bhandara du ver à soie tasar tropical ce qui permet de les différencier en des groupes différents. Si l'on trouve des différences non significatives on peut conclure que deux groupes sont similaires et ils ont le même taux de variations entre les traits comparés (Yadav et Goswami, 1992).

Le coefficient de corrélation (r) et l'analyse de régression d'autre part concernent la relation entre la longueur du cocon et la largeur du cocon, la circonférence horizontale des cocons, la circonférence longitudinale des cocons la circonférence horizontale $\times$ longitudinale et le volume des cocons ce qui permet une analyse comparative très utile pour distinguer différents variants morphologiques de morphotypes ou de biotypes.

Ainsi, en appliquant cette analyse morphométrique et en utilisant une méthode statistique élaborée, on pourrait différencier différents types de l'écorace Bhandara comme des groupes morphogénétiques différents et les connaître clairement comme des morphotypes ou des biotypes différents n'ayant pas été identifiés et distingués auparavant.

FRACTIONATION OF SILK PROTEINS (*BOMBYX MORI*) BY PRECIPITATION TECHNIQUES AND HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY

G. FREDDI¹ & G. ALLARA²

1. Stazione Sperimentale per la Seta, via Giuseppe Colombo, 81, 20133 Milano, Italy.

2. Ratti Technologies, via Madonna, 30, 22070 Guanzate, Como, Italy.

Bombyx mori cocoons were dissolved with 60% LiSCN and the silk protein mixture was fractionated by using conventional precipitation techniques. Silk protein fractions obtained by salting-out at 19%, 30% and 50% ammonium sulphate were characterised by means of amino acid analysis and size exclusion chromatography. Reciprocal contamination between fibroin H- and L-chains and sericin was observed. By decreasing the concentration of urea from 5M to 2M, fibroin H- and L-chains co-precipitated at 19% ammonium sulphate. By using polyethylene glycol as precipitating agent, silk proteins precipitated in a single step at high polymer concentration (>35 % and > 40% w/v for PEG 400 and PEG 4000, respectively). Hydrophobic interaction chromatography was applied to the fractionation of a silk protein solution. Adsorption of silk proteins to the HIC packing (TSK-gel Phenyl-5PW) was promoted at low ionic strength (< 0.5M ammonium sulphate). Silk proteins were then eluted by a negative gradient of ionic strength in the following order: sericin, fibroin H-chain and L-chain. The effect of various parameters, such as initial ionic strength, gradient slope, pH of the eluent, concentration of urea in the mobile phase, on the elution behaviour of silk proteins were investigated. With an initial ionic strength corresponding to ≤ 0.2 M ammonium sulphate and a gradient slope of 0.025M/ml, sericin and fibroin were quantitatively separated in a single chromatographic run. pH changes in the range 7-9 slightly influenced protein retention without improving peak resolution. The presence of 5M urea in the mobile phase weakened the hydrophobic interactions of fibroin H-chain with the HIC packing, resulting in a partial loss of selectivity. On the basis of the accumulated results, a protocol for the fractionation of silk proteins on a preparative scale can be developed. Finally, five sericin polypeptides characterised by weak hydrophobic interactions with the HIC packing were isolated and their amino acid composition was determined.

Keywords: *Bombyx mori* silk, salting-out, hydrophobic interaction chromatography

INTRODUCTION

The raw silk thread spun by the silkworm *Bombyx mori* to build a cocoon at the end of its larval life has a characteristic 'sheath-around-two-cores' composite structure. Two continuous fibroin filaments are surrounded and glued together by a protein gum called sericin. Silk fibroin accounts for 75-83 w% of raw silk, while sericin varies from 17w% to 25w%, depending on the species, origin, culture conditions, etc. Sericin is usually removed from silk yarns or fabrics during textile processing by means of hot soap solutions, alkali solutions, or by enzymes. Fibroin is synthesised in the secretory cells of posterior silk gland and is formed by a large polypeptide called H-chain, of about 350 kD (Shimura, 1988) and two light protein subunits, L-chain (Shimura, 1988) and P25 (Chevillar *et al.*, 1986), with a molecular weight of about 25 kD. L- and H-chains are connected by a disulphide bond

(Shimura, 1988), while P25 does not seem to be covalently bound to the H-chain (Tanaka *et al.*, 1993). The term sericin indicates a mixture of proteins differing in composition and size, synthesised in the middle silk gland (Gamo *et al.*, 1977; Ishikawa and Suzuki, 1985; Michaille *et al.*, 1988, 1989). The molecular weight of these proteins, characterised by a high serine content, may range from 65kD to 400kD. The sericin layer of the silk thread is thought to contain from five to nine polypeptides, some of which are glycosylated (Sinohara, 1979).

During fibre spinning by the silkworm, the concentrated protein solution stored in the gland undergoes a progressive mechanical denaturation brought about by joint forces of ejection and drawing exerted by the silkworm, accompanied by extensive loss of water (Iizuka, 1985). Both fibroin and sericin become insoluble, assuming the characteristic physical, chemical, and mechanical properties which are highly appreciated by textile technologists and set silk apart from other natural and synthetic fibres (Kaplan *et al.*, 1991). As a result, dissolution of silk is a quite difficult process, because it requires swelling of the compact fibre structure and breaking of the strong inter and intra molecular hydrogen bonds stabilising the fibre structure. Almost complete dissolution of silk can be achieved by means of suitable solvents, such as concentrated solutions of Li salts. LiSCN is preferable because it is active at room temperature, its solution is neutral and it is unlikely to cause peptide bond hydrolysis (Lucas *et al.*, 1958). Then, a buffered aqueous solution of silk proteins can be easily prepared by dialysis against a suitable solvent.

The preparation of aqueous silk solutions may be required for both analytical and preparative purposes. A stable water solution is a prerequisite for the application of electrophoretic and chromatographic techniques to the analysis of silk proteins. These analytical approaches are of primary importance for the purification and characterisation of individual components in native silk proteins, as well as for studying the effect of various physico-chemical treatments (such as those to which silk is subjected during processing) on the integrity of the fibre. On the other hand, silk is attracting both academic and technological interest as a source of biopolymers with outstanding functional properties (Bunning *et al.*, 1994). The increasing demand of new materials with selected functionalities for application in the biotechnological and biomedical fields is stimulating a great deal of studies on natural polymers, especially on silk. Biosensors developed by the enzyme immobilization technique (Asakura *et al.*, 1992; Furuhashi *et al.*, 1997), membranes with selective permeability (Hirotsu *et al.*, 1988; Minoura *et al.*, 1990), biocompatible devices for controlled drug release (Tsukada *et al.*, 1994) and with wound-repairing functions (Tanada, 1998) are some of the applications already developed or suggested for silk fibroin. Sericin is also attractive, however its utilisation is limited by the fact that at present this protein fraction is recovered from waste water after degumming, a process which induces extensive degradation of the physico-chemical structure of the proteins. For this reason, sericin has been mainly used in form of hydrolysate as additive for cosmetics.

The possibility of solubilizing raw silk wastes and fractionating the silk protein mixture by means of preparative-scale chromatographic techniques would certainly promote an effective exploitation of both fibroin and sericin. Unreelable cocoons and various kinds of silk wastes may be suitable starting materials for the preparation of sericin and fibroin for non-textile applications. Moreover, silk proteins might also be recovered as by-product from a biotechnological process which utilises transgenic silkworms for the production of a protein of interest. Assuming that this protein is secreted into the silk gland and incorporated in the cocoon, its purification might produce large amounts of 'silk wastes', whose recycling might become a profitable process, provided that effective solubilization and fractionation protocols are set up.

After dissolution with LiSCN and dialysis, silk proteins can be fractionated by salting-out, i.e. fractional precipitation by addition of increasing amounts of a neutral salt (ammonium sulphate) to the solution (Shimura *et al.*, 1976, 1982). In the present study, this classical fractionation method has been revised and the influence of urea concentration on protein precipitation has been investigated. The use of non-ionic water soluble polymers for silk protein precipitation has also been studied. Since these methods are time consuming and are characterised by a low resolving power, we applied modern chromatographic techniques to silk protein fractionation, with special attention to hydrophobic

interaction chromatography (HIC). HIC has soon appeared quite promising to our aim because the retention mechanism is characterised by a high specificity, and the process of adsorption-desorption of proteins is driven by the same forces involved in salting-out (Melander and Horvath, 1977). Moreover, thanks to the weak interactions between protein molecules and column packing material, as well as to the use of aqueous buffers, the biological activity of an eventual protein of interest mixed with silk proteins could be probably retained.

MATERIALS AND METHODS

Newly formed cocoon shells were defatted with diethyl ether. Layers were separated manually, cut into small pieces and dissolved with 20 volumes of 60% LiSCN. Complete dissolution was achieved in about 90 min, at 40°C, under gentle stirring. The solution was then dialysed against 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 2 M or 5 M urea.

Reduction and carboxymethylation of silk proteins was performed according to the method of Shimura *et al.* (1976). Fractions of silk proteins were prepared by fractional precipitation with ammonium sulphate at 19%, 30% and 50% (w/v). Precipitates were collected by centrifugation at 24000 g for 30 min and freeze dried. For chromatographic analyses precipitates were dissolved with 60% LiSCN and dialysed against the mobile phase buffer.

Tests of precipitation with polyethylene glycol (PEG 400 and PEG 4000, Merck) were performed by adding the required amount of polymer to a buffered silk proteins solution, the final PEG concentration ranging from 5% to 50% (w/v). After 1 h at 0°C, samples were centrifuged at 24000 g for 30 min. Protein concentration in the supernatant was determined spectrophotometrically at 274 nm ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 11.3$, Iizuka and Yang, 1968).

Size exclusion chromatography (SEC) analyses were performed on a 60×1 cm glass column packed with Fractogel TSK HW 65 (Merck), at a flow rate of 1 ml/min, using 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8) with 5 M urea and 0.1 M KCl as mobile phase. The eluate was detected at 274 nm.

Hydrophobic interaction chromatography (HIC) analyses were carried out on a 7.5×0.75 cm TSK-gel Phenyl-5PW column (LKB), at a flow rate of 1 ml/min. The starting mobile phase was a 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 2 M urea and 0.5 M ammonium sulphate. Proteins were eluted with a negative gradient of ammonium sulphate from 0.5 M to 0 M, and detected at 225 and 274 nm.

The amino acid composition was determined by acid hydrolysis at 105°C for 24 h under vacuum. Free amino acid residues were derivatized with phenyl isothio-cyanate (Sigma) and eluted on a 30 × 0.39 cm reversed-phase column (PicoTag, Waters) at a flow rate of 1 ml/min. Eluate was detected at 254 nm. The quantitative amino acid composition was determined by external standard calibration (Amino Acid Standard H, Pierce).

RESULTS AND DISCUSSION

Fractionation of silk proteins by precipitation techniques:

The selective precipitation of proteins by addition of high concentrations of neutral salts (usually ammonium sulphate) or non-ionic, water soluble polymers (polyethylene glycol) is a classical fractionation technique used for preparative purposes in the early stages of many protein purification schemes. Although these techniques have a low resolving power, they aim at concentrating, clarifying and purifying crude protein extracts for subsequent purification steps.

Precipitation with ammonium sulphate:

Shimura *et al.* (1982) developed a protocol for the fractionation of silk proteins from cocoons by precipitation with 19%, 30% and 50% ammonium sulphate. The same fractionation scheme was applied in this study to a solution of reduced and carboxymethylated silk proteins in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 5 M urea. Table I lists the results of the amino acid composition of the fractions collected after each precipitation step, as well as a semi-quantitative evaluation of protein yield. The

19% precipitate has an amino acid composition referable to fibroin L-chain. As it will be shown later, the small fibroin subunit was the main component of this fraction. The 30% precipitate clearly corresponds to the fibroin H-chain, as shown by the characteristic high content of glycine, alanine, serine and tyrosine, whose concentration accounts for about 93 mol % of the total amino acid residues. The ratio between the amount of proteins recovered at 19% and 30% ammonium sulphate was 9:91, indicating a 1:1 molar ratio between light and heavy silk fibroin chains (Shimura, 1988). The mixture of proteins precipitated at 50% ammonium sulphate can be ascribed to silk sericin, as indicated by the high serine content.

Table I. Amino acid composition of total (pH) cocoon proteins and 19%, 30% and 50% precipitates obtained by ammonium sulfate fractionation of a silk protein solution in Tris-HCl buffer (pH 8) with 5M urea.

Tableau I. Composition en acides aminés de l'ensemble des protéines du cocon et de précipités de 19 %, 30 % et 50 % obtenus par fractionnement du sulfate d'ammonium d'une solution de protéines de soie dans un tampon Tris-HCl (pH 8) avec 5M d'urée.

Amino Acids (mol %)	Total cocoon Proteins	19% Precipitate	30% Precipitate	50% Precipitate
<i>Acides aminés (mol %)</i>	<i>Protéines totales du cocon</i>	<i>Précipité à 19 %</i>	<i>Précipité à 30 %</i>	<i>Précipité à 50 %</i>
Aspartic acid / <i>Acide aspartique</i>	3.86	13.56	1.30	10.41
Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	1.90	8.92	1.08	2.92
Serine	15.88	10.93	12.03	26.92
Glycine	39.66	14.90	46.27	24.64
Histidine	0.36	1.79	=	0.96
Arginine	1.20	4.40	0.53	2.78
Threonine	2.35	3.24	0.88	6.49
Alanine	25.18	15.64	29.10	13.54
Tyrosine	4.80	4.33	5.23	4.42
Valine	2.29	5.75	2.01	2.80
Isoleucine	0.70	5.68	0.46	0.81
Leucine	0.69	6.52	0.35	1.14
Phenylalanine	0.64	2.98	0.58	0.59
Lysine	0.51	1.36	0.17	1.59
Protein yield (w %)	=	5.7	59.0	17.3
<i>Rendement en protéines (p %)</i>				

Although each one of the above fractions seem to correspond to a well defined silk protein component, a certain degree of contamination should be expected, due to the poor resolution of the fractionation method. SEC analysis of ammonium sulphate precipitates (Fig. 1) confirmed this hypothesis. The 19% fraction exhibited a major peak in the low molecular weight range (fibroin L-chain), preceded by a weak and broad peak at higher molecular weights. The latter was collected

and from its amino acid composition it has been possible to attribute these proteins to sericin components with a serine content of about 20 mol %. The 30% precipitate displayed an intense peak centered at about 350kD (fibroin H-chain), followed by a low molecular weight peak appearing on the tail of the major peak. The amino acid composition of the chromatographic fraction corresponding to the small shoulder peak is similar to that of the L-chain subunit of silk fibroin. These findings imply that, in our experimental conditions, fibroin L-chain was not completely precipitated at 19% ammonium sulphate and that slight adjustments of salt concentration would have been required to optimise the recovery of this protein fraction.

Table II. Amino acid composition of the chromatographic fractions collected from the SEC eluate of the 50% precipitate (indicated by arrows in the chromatogram of Fig. 1)

Tableau II. Composition des acides aminés des fractions chromatographiques recueillies sur l'éluat SEC du précipité 50 % (indiquée par les flèches dans le chromatogramme de la Fig. 1).

Amino acids (mol %)	Fraction 4	Fraction 11	Fraction 15
<i>Acides aminés (mol %)</i>	<i>Fraction 4</i>	<i>Fraction 11</i>	<i>Fraction 15</i>
Aspartic acid / <i>Acide aspartique</i>	16.1	10.0	17.3
Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	3.7	2.8	5.5
Serine	35.8	25.7	15.4
Glycine	14.1	25.0	21.3
Histidine	1.4	0.9	2.0
Arginine	3.8	2.7	2.8
Threonine	9.2	6.5	4.8
Alanine	4.6	14.7	15.5
Tyrosine	2.9	3.8	3.3
Valine	3.4	2.9	3.3
Isoleucine	1.0	1.1	2.3
Leucine	1.2	1.2	2.5
Phenylalanine	0.4	0.6	1.4
Lysine	2.3	2.2	1.6

The chromatographic behaviour of the 50% precipitate was characterised by the presence of protein fractions covering the entire fractionation range of the column, with a prevalence of middle-to-low molecular weight proteins. In order to characterise the sericin components present in the 50% precipitate, sub-fractions of 1 ml eluate were collected and their amino acid composition was determined. Table II shows the amino acidic pattern of three sub-fractions representative of the three major sericin components identified in the precipitate. These can be classified as 'high', 'middle' and 'low serine' sericins, with a serine content of 33-36 mol %, 22-27 mol % and 13-18 mol %, respectively. It is interesting to note that the higher the molecular weight, the higher the serine concentration, in agreement with the results of Gamo *et al.* (1977), who found serine-rich sericins

with molecular weights ranging from 200 kD to 400kD. On the other hand, low molecular weight sericins were characterised by a lower content of serine. These results give evidence of the variability in molecular weight and amino acid composition of silk sericins. Other sericin fractions remained in the supernatant after precipitation with 50% ammonium sulphate. Details on these polypeptides will be given in the last paragraph. It is worth noting that some of the above fractions displayed glycine and alanine concentrations higher than expected for sericins. These might be attributed to contamination by fibroin polypeptides co-precipitating with sericins.

The effect of urea concentration on the salting-out of silk proteins is worth of further discussion. The addition of high concentrations of neutral salts (kosmotropes) to a protein solution causes protein precipitation by perturbing the protein-solvent interaction. As a chaotrope, urea tends to counteract the effect of salt. In the fractionation protocol of Shimura *et al.*, (1982) the equilibrium between the amount of urea present in the buffered medium (5M) and the amount of ammonium sulphate added to the silk protein solution drives the precipitation of fibroin and sericins in the above discussed order. A decrease in urea concentration may cause changes in the precipitation pattern of silk. To verify this hypothesis, urea was decreased from 5M to 2M, while the steps of ammonium sulphate addition were kept constant. From the results of amino acid composition and protein yield (Table III) it has been possible to observe that the 19% precipitate was formed by both fibroin L- and H-chains, as confirmed by SEC analysis (chromatogram not shown). The 30% precipitate was negligible, while the 50% precipitate contained sericin fractions with an average serine concentration higher than that of the corresponding fraction recovered from the 5M urea buffer system (see Table I). These results indicate that the precipitation behaviour of silk proteins was markedly influenced by changing urea concentration and that this parameter can be used to modulate the fractionation process in order to meet different analytical and/or processing needs. In particular, a decrease from 5M to 2M urea permitted to separate fibroin from sericin in a single step, at a relatively low salt concentration (19%). This may be considered an interesting approach for the separation of the two major silk components from a solution obtained by dissolving raw silk (unreelable cocoons, silk wastes, etc.) and for the subsequent utilisation of these biopolymers for both textile and non-textile applications.

Precipitation with polyethylene glycol:

The use of non-ionic, water soluble polymers, such as PEG, for the fractional precipitation of proteins has been reported for various complex protein mixtures, but not for silk proteins. The advantages of PEG as a fractional precipitating agent consist primarily in its little tendency to denature or otherwise interact with proteins. The mechanism of protein precipitation can be qualitatively explained on the basis of a steric exclusion process, by which proteins are concentrated in the extra-polymer space, thus exceeding their solubility limit. PEG molecular weight and concentration on one side, protein dimensions on the other appear to be the main parameters influencing the precipitation behaviour.

Two kinds of PEGs with molecular weight of 400 D and 4000 D were used in our fractionation tests. Increasing amounts of PEG in the concentration range 5-50% (w/v) were added to a silk protein solution in 20mM Tris-HCl buffer (pH 8) with 2M urea. The behaviour of protein solubility as a function of increasing PEG concentration showed that no precipitation occurred at low-to-medium polymer concentrations. The amount of polymer required to precipitate silk proteins was very high (> 35% and > 40% for PEG 400 and PEG 4000, respectively). Moreover, precipitation probably occurred in a single step, i. e. the whole silk proteins or the largest portion of them precipitated at the same time, as evidenced by the sharp drop of the solubility curve. The extremely high viscosity of the solution made it difficult to go deeper into the kinetics of silk proteins precipitation. For this reason, as well as for the problems arising from the need of removing such a large amount of PEG, this precipitation method was considered not suitable for early stage silk proteins fractionation.

Hydrophobic interaction chromatography of silk proteins:

HIC has been introduced in the early 1970s and has rapidly become a popular chromatographic technique for both analytical and preparative applications. The separation mechanism used in HIC is based on the use of weak hydrophobic interactions which take place between proteins and a stationary phase. The latter may be an organic (agarose, various synthetic polymers) or inorganic (silica) matrix, to which weakly hydrophobic ligands (such as methyl, propyl, butyl, phenyl groups) are bound. In HIC the interactions between proteins and ligands are promoted by a high-ionic strength mobile phase and then proteins are desorbed by a negative gradient of ionic strength. Selectivity in HIC can be easily manipulated through mobile phase and stationary phase variables. The former include salt type and concentration, pH, the latter mainly refer to ligand chain length, density and hydrophobicity.

There are many similarities in the forces involved in both the Adsorption of a protein to a HIC stationary phase and the salting-out process. Melander and Horvath (1977) have shown that the increased surface tension of water induced by the salt favours protein-protein contacts in salting-out and protein-ligand contacts in HIC. Proteins are expected to elute from a HIC column in the reverse order relative to their precipitation by salt. In our tests, ammonium sulphate was used to promote protein binding to the stationary phase. The column packing was a TSK-gel Phenyl-5PW resin, a macroporous synthetic hydrophilic polymer (500-1000 Å pore size, 10 µm particle diameter), with phenyl ligands (density: 100 µmol/ml). This HIC packing, characterized by good mechanical and chemical stability, high adsorption capacity for large molecules and rather high hydrophobicity, has been extensively studied (Kato *et al.*, 1985; Huang and Guiochon, 1989) purposes.

Isocratic analyses:

To study the effect of ionic strength on the adsorption of silk proteins to the stationary phase, protein samples were eluted isocratically at increasing salt concentrations by using a 20mM Tris-HCl buffer (pH 8) with 2M urea as mobile phase (Fig. 2). In the absence of ammonium sulphate silk proteins eluted at the solvent front. No interactions were established between proteins and stationary phase, which operated in a purely size exclusion mode. The absence of separation among the silk protein components with different molecular size was mainly due to the large porosity of the resin, which did not allow selective permeation. By gradually increasing the concentration of salt in the mobile phase until 0.5M, the amount of retained proteins increased. These were eluted only by the mobile phase with the lowest ionic strength (0M salt). By plotting the area of the retained peak as a function of ammonium sulphate concentration (Fig. 3), it can be observed that protein retention occurred through discrete steps. This means that the different silk protein fractions could establish selective interactions with the HIC stationary phase, according to their structure (surface hydrophobicity) and to mobile phase composition. It is interesting to note that adsorption of silk proteins to the HIC packing was promoted at low ionic strength, much lower than that at which HIC columns are usually operated (Kennedy, 1990).

Gradient analyses:

The result of isocratic analyses permitted to develop a protocol for the elution of a crude silk protein extract on the TSK-gel Phenyl-5PW column. Interactions with the stationary phase were promoted by means of an initial mobile phase with 0.5 M ammonium sulphate. Then, proteins were eluted with a negative gradient of ionic strength from 0.5 M to 0 M salt. Figure 4 shows the elution profile obtained with a 20 min gradient ($\Delta[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = -0.025\text{M/ml}$), followed by a final isocratic step of 20 min to ensure complete elution of the most strongly retained protein fractions. The main features were a series of medium intensity peaks (I) eluting within 10 min from the injection, followed by various broadly eluting peaks (II), which preceded the strongest chromatographic peak (III) appearing about 21 min after injection. Finally, a minor but well resolved peak (IV) eluted at about 24 min in almost isocratic conditions. Since we may expect that silk proteins eluted from the HIC column in the reverse order relative to the sequence of precipitation with ammonium sulphate, fractions I and II should correspond to sericins, while fractions III and IV to fibroin H- and L-chains

respectively. This hypothesis was confirmed by analysing the fractions obtained by ammonium sulphate precipitation.

To optimise the elution of silk proteins on the HIC packing, the effect of various parameters on the elution pattern was investigated. On increasing the gradient slope from 0.0125 M/ml to 0.5 M/ml a gradual loss of resolution was observed (Fig. 5). A change in mobile phase ionic strength corresponding to a decrease of ammonium sulphate concentration of 0.025 M/ml could be considered

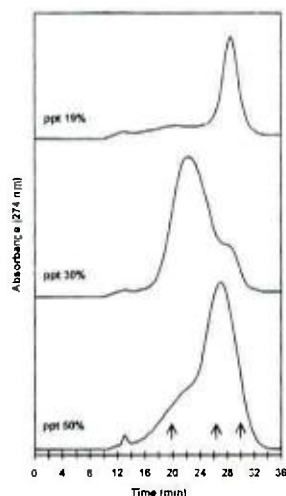


Fig 1. SEC analyses of silk protein fractions precipitated with 19%, 30% and 50% ammonium sulphate. Column: Fractogel TSK HW 65. Eluent: 20mM Tris-HCl (pH8), 5 M urea, 0.1 M KCl. Flow rate: 1 ml/min. Detection: 274 nm.

Fig 1. Analyses SEC de fractions de protéines de soie précipitées avec 19 %, 30 % et 50 % de sulfate d'ammonium. Colonne: Fractogel TSK HW 65. Eluant: 20mM Tris-HCl (pH 8) 5 M urée, 0,1 M KCl. Vitesse d'élution: 1 ml/min. Détection: 274 nm.

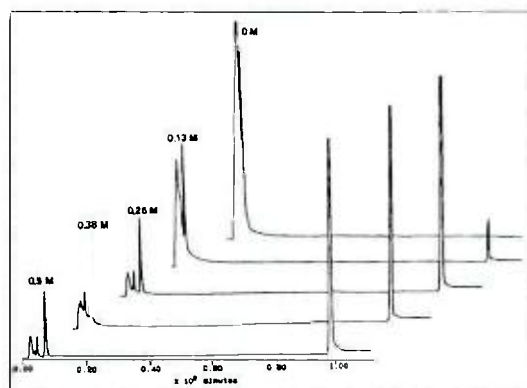


Fig 2. HIC isocratic analyses of silk proteins. Column: TSK-gel Phenyl-5PW. Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8), 2M urea and variable amounts of ammonium sulphate (0 - 0.5 M). Flow rate: 1 ml/min. Detection: 225 nm. After 60 min, retained proteins were eluted with a mobile phase without ammonium sulfate.

Fig 2. Analyses isocratiques HIC des protéines de soie. Colonne: gel TSK Phényle - 5PW. Eluant: 20 mM Tris-HCl (pH 8), 2 M urée quantités variables de sulfate d'ammonium (0 - 0.5M) Vitesse d'élution: 1 ml/min. Détection: 225 nm. Après 60 minutes, les protéines retenues sont éluées avec une phase mobile sans sulfate d'ammonium.

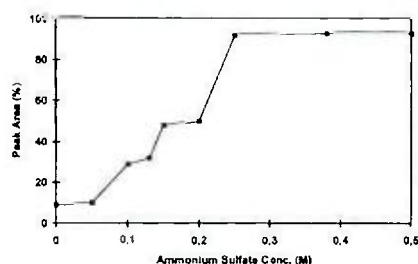


Fig 3. Amount of silk proteins retained by the HIC packing vs. ammonium sulphate concentration in the mobile phase.

Fig 3. Quantité de protéines de soie retenues par le complexe HIC en fonction de la concentration de sulfate d'ammonium dans la phase mobile.

a good compromise between peak resolution and total length of the chromatographic run.

The influence of the initial salt concentration on the elution pattern was also studied. Different initial mobile phases with salt concentrations ranging from 0.5M to 0.15M were tested, the gradient slope being constant (0.025 M/ml). Peaks I and II tended to merge at an initial salt concentration <0.25M (Fig. 6), suggesting that sericin polypeptides moved faster along the column. Accordingly, the intensity of peak III decreased, while peak IV was almost unaffected. At 0.15M salt, the intensity ratio between peaks (I+II) and (III+IV) was about 25:75, which roughly corresponds to the quantitative ratio between sericin, fibroin H- and L-chains in the cocoons. Fraction identity was confirmed by amino acid analysis. These findings, besides showing that retention of silk proteins on the HIC column can be easily modulated by changing the mobile phase composition, demonstrate that the most important silk protein fractions can be fractionated in a unique chromatographic run, instead of performing the time consuming salting-out procedure.

It has been reported that mobile phase pH may indirectly influence protein retention on a HIC stationary phase by changing the ionization state of charged amino acid residues located at the surface of the molecule (Kennedy, 1990), and that small changes in eluent pH might be exploited as a tool to adjust selectivity and optimise resolution between different components of the protein mixture to be fractionated. A decrease in mobile phase pH is expected to result in an increase of protein retention, though different protein-stationary phase systems may behave differently. Shifts of the chromatographic peaks in the range 5-8 can be due to changes in the ionization state of surface histidine residues. The effect of pH on silk proteins elution was studied in the range 7-9. Retention times decreased slightly at pH 9, and increased at pH 7, without significantly improving peak

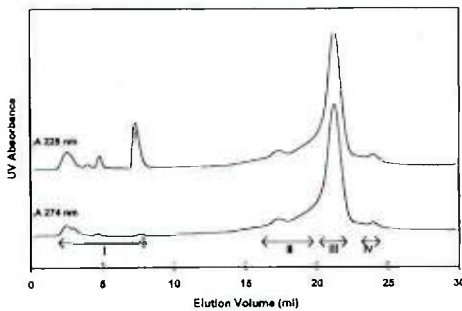


Fig 4. HIC gradient analyses of silk proteins. Column: TSK-gel Phenyl- 5 PW. Eluent: (a) 20mM Tris-HCl (pH 8), 2M urea, 0.5M ammonium sulphate; (b) same as (a), without ammonium sulphate. Flow rate: 1 ml/min. Detection: 225 nm and 274nm. Initial isocratic step of 2 min with eluent (a). Gradient from 0.5 M to 0M ammonium sulphate over 20 min (gradient slope: 0.025M/ml). Isocratic step of 8 min with eluent (b).

Fig 4. Analyses en gradient des protéines de soie sur HIC. Colonne : gel-TSK Phényle - 5 PW. Eluent (a) 20mM Tris-HCl (pH 8), 2M urée, 0,5 de sulfate d'ammonium ; (b) identique à (a) sans sulfate d'ammonium. Vitesse d'élution : 1 ml/min. Détection : 225 nm et 274 nm. Etape isocratique initiale de 2 min, avec l'éluant (a). Gradient d'élution de 0,5 à 0M de sulfate d'ammonium pendant 20 min. (pente gradiente : 0,025 M/ml). Etape isocratique de 8 min avec l'éluant (b).

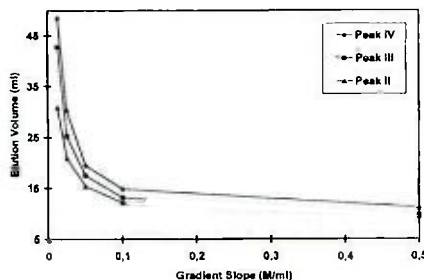


Fig 5. Behaviour of resolution of the major silk protein peaks vs. gradient slope.

Fig 5. Résolution des pics principaux de protéines de soie en fonction de la pente du gradient.

resolution. The marginal changes observed in silk protein retention permit to conclude that a mobile phase pH of 8 can be considered an optimum value for the elution of silk proteins on the HIC packing.

Urea is an important component of the solvent system used for silk proteins because it gives enough stability to the solution to allow its subsequent analysis. However, the presence of urea in the mobile phase is thought to influence the protein-stationary phase interactions by enhancing protein desorption (Goheen and Engelhorn, 1984; Kato *et al.*, 1984b). To study the effect of urea on the elution pattern of silk proteins, samples were eluted with a mobile phase containing 5 M urea and variable amounts of ammonium sulphate (0.5-0.1M). The results showed that the intensity of peak I (weakly retained proteins) increased as the initial salt concentration decreased. An example of this behaviour is given in Figure 7. Fractions corresponding to the three major peaks were collected and eluted with a 2M urea mobile phase. The results show that the weakly retained peak contained not only sericins but also fibroin H-chain. These findings confirm that high urea concentrations in the mobile phase weakened the hydrophobic interactions of fibroin H-chain with the HIC packing, resulting in a partial loss of selectivity. Therefore, for the development of an efficient fractionation protocol of silk proteins by HIC, salt and urea concentrations must be properly adjusted, taking into account the hydrophobicity of both stationary phase and proteins.

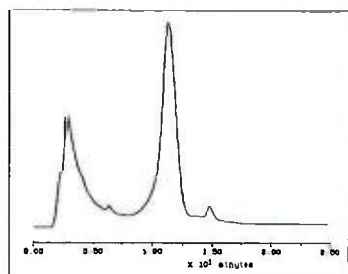


Fig 6. Influence of initial ammonium sulphate concentration (0.15 M) on the elution pattern of silk proteins. Other conditions as in Figure 4.

Fig 6. Influence de la concentration initiale en sulfate d'ammonium (0.15 M) sur le profil d'élution des protéines de soie. Les autres conditions sont les mêmes que pour la figure 4.

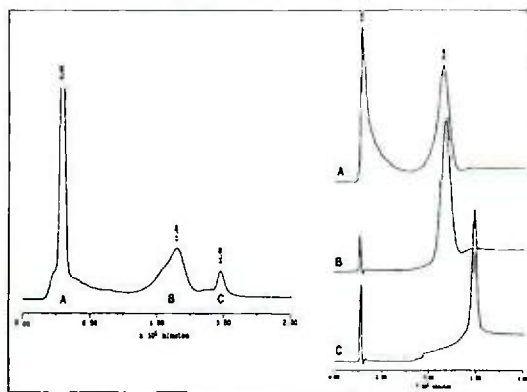


Fig 7. Influence of urea concentration (5 M) on retention of silk proteins on the HIC packing. Fractions A, B and C, were collected and analysed with a mobile phase with 2 M urea. Other conditions as in Figure 4.

Fig 7. Influence de la concentration d'urée (5 M) sur la rétention des protéines de soie sur HIC. Les fractions A, B et C sont recueillies et analysées par phase mobile avec urée 2 M. Les autres conditions sont les mêmes que pour la figure 4.

Table III. Amino acid composition of silk proteins precipitated at 19 %, 30 % and 50% ammonium sulfate from a solution in Tris-HCl buffer (pH 8) with 2M urea.

Tableau III. Composition en acides aminés des protéines de soie précipitées à 19 %, 30 % et 50 % de sulfate d'ammonium à partir d'une solution tampon Tris Hcl (pH 8) avec urée 2M.

Amino acids (mol %)	19% Precipitate	30% Precipitate	50% Precipitate
<i>Acides aminés (mol %)</i>	<i>Précipité à 19 %</i>	<i>Précipité à 30 %</i>	<i>Précipité à 50 %</i>
Aspartic acid / <i>Acide aspartique</i>	4.28	5.18	14.18
Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	2.35	1.83	3.04
Serine	14.97	18.43	33.29
Glycine	39.10	35.48	18.72
Histidine	0.42	0.20	1.20
Arginine	1.30	1.68	2.91
Threonine	1.99	3.81	8.55
Alanine	24.55	22.59	7.19
Tyrosine	4.86	3.86	3.85
Valine	2.62	3.65	3.41
Isoleucine	1.01	1.12	0.72
Leucine	1.05	0.91	1.00
Phenylalanine	0.83	0.61	0.34
Lysine	0.68	0.66	1.60
Protein yield (w%)	68.4	0.6	19.5
<i>Rapport protéines (p %)</i>			

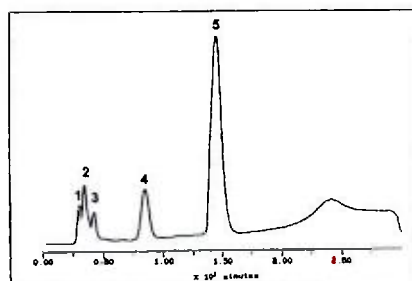


Fig 8. HIC analysis of the 50% supernatant remaining after ammonium sulphate precipitation. Gradient from 1.6 M to 0 M ammonium sulphate in 20 min. Other conditions as in Figure 4.

Fig 8. Analyse HIC du surnageant à 50% demeurant après la précipitation au sulfate d'ammonium. Gradient à 0 M de sulfate d'ammonium en 20 minutes. Les autres conditions sont les mêmes que pour la figure 4.

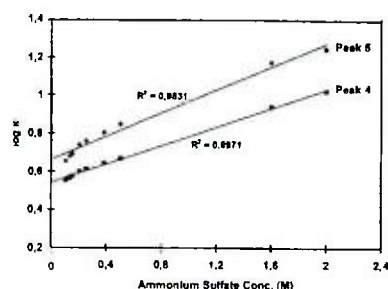


Fig. 9 Peak capacity factor vs. ammonium sulphate concentration of two sericin polypeptides.

Fig 9. Facteur de capacité pic en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium pour deux polypeptides de sérine.

For the TSK-gel Phenyl-5PW, a mobile phase containing 2M urea allows good silk protein solubility and minimises irreversible protein binding, without affecting the selectivity of the stationary phase.

Amino acid composition of some sericin polypeptides:

The silk protein solution prepared by dissolving the cocoons contains some polypeptides weakly retained by the HIC stationary phase, which usually eluted within 10 min from injection (see Fig. 4). The same peaks were detected by analysing the supernatant remaining after precipitation

Table IV. Amino acid composition of sericin polypeptides remaining in the supernatant after precipitation with 50% ammonium sulfate (see chromatogram of Fig 9)

Tableau IV. Composition en acides aminés des polypeptides de sérine restant dans le surnageant après précipitation avec 50 % de sulfate d'ammonium (voir chromatogramme de la Fig 9)

Amino acids (mol %)	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
Acides aminés (mol %)	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4	Pic 5
Aspartic acid / Acide aspartique	16.54	16.64	15.41	13.14	10.69
Glutamic acid / Acide glutamique	5.63	5.25	7.69	7.89	10.20
Serine	39.45	35.54	27.82	21.64	19.43
Glycine	13.67	13.98	15.34	16.68	17.98
Histidine	1.36	1.45	1.30	=	1.04
Arginine	3.15	3.48	3.88	3.80	3.75
Threonine	7.89	8.50	7.21	7.26	5.87
Alanine	3.58	4.41	6.82	8.93	6.37
Tyrosine	2.20	2.36	2.35	1.78	3.50
Valine	2.72	3.45	3.76	6.18	6.58
Isoleucine	0.45	1.01	2.12	3.41	3.62
Leucine	0.23	0.83	2.05	3.38	4.58
Phenylalanine	0.14	0.46	1.22	2.32	2.37
Lysine	2.99	2.63	3.03	3.60	4.04

with 50% ammonium sulphate (Fig. 8). Although weakly retained, the nature of their interactions with the stationary phase was mainly of the hydrophobic type (Fausnaugh and Regnier, 1986), as shown by the linear relationship between peak capacity factor and concentration of ammonium sulphate (Fig. 9). A characteristic of these peaks was to display a spectrophotometric response at 225 nm comparatively higher than that at 274 nm. This fact, as well as their weak hydrophobicity suggest that these polypeptides might belong to the glycosylated silk sericin fraction.

By using an initial mobile phase with 1.6M ammonium sulphate at least five peaks were separated, three of them being poorly resolved (Fig. 8). Fractions corresponding to the above peaks were collected and their amino acid composition was determined (Table IV). Peaks 1-3 displayed the characteristic amino acid composition of silk sericin. Judging from the high serine content, these polypeptides seem to correspond to the S3 fraction isolated by Gamo *et al.*, (1977) from the silk gland. Peaks 4 and 5 were characterised by a lower serine content and could be related to the S5 sericin fraction of Gamo *et al.*, (1977).

CONCLUSIONS

The results reported in this study show that hydrophobic interaction chromatography can be successfully applied for the fractionation of silk protein solutions. Adsorption of silk proteins to the HIC packing was promoted at a very low ionic strength (≤ 0.5 M ammonium sulphate), much lower than that used to drive hydrophobic interactions of globular proteins. Only few sericin polypeptides were not retained in these conditions. By decreasing the ionic strength, silk proteins were eluted in the following order: sericins, fibroin H-chain and fibroin L-chain. Urea concentration > 2 M in the mobile phase interfered with protein retention, acting as a desorption agent.

On the basis of the accumulated results, a fractionation protocol of a crude silk protein extract may include the following steps: (a) dissolution of silk proteins by means of saturated LiSCN (or LiBr), followed by dialysis against a suitable buffer; (b) loading of the protein mixture onto a HIC column at a moderate ionic strength (≤ 0.5 M ammonium sulphate); (c) sequential elution of sericin and fibroin polypeptides by gradually decreasing the ionic strength. This procedure is expected to produce silk protein fractions highly enriched in sericin and fibroin in a single chromatographic run, avoiding the time consuming procedure of salting-out. Finally, preparative and process scale applications can be easily developed from the laboratory scale results.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the European Commission DG XII HMSU, Science Research and Development, Joint Research Centre (Contract No. CH1*-CT94-0092).

REFERENCES

- ASAKURA T., KITAGUCHI M., DEMURA M., SAKAI H., KOMATSU K. (1992) Immobilization of glucose oxidase on non-woven fabrics with *Bombyx mori* silk fibron gel. *J. Appl. Polym. Sci.*, 46, 49-53.
- BUNNING T. J., JIANG H., WADE ADAMS W., CRANE R. L., FARMER B., KAPLAN D. L., (1994) Silk polymers. *Materials Science and biotechnology*, 353-358, D. Kaplan, W. Wade Adams, B. Farmer and C. Viney Eds., ACS Symposium Series 544, American Chemical Society, Washington, DC.
- CHEVILLARD M., DELEAGE G., COUBLE P. (1986) Aminoacidic sequence and putative conformational characterisation of the 25 kD silk protein of *Bombyx mori*, *Sericologia*, 26(4), 435-449.
- FAUSNAUGH J. C. & REGNIER F. E. (1986) Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins, *J. Chromatogr.*, 359, 131-146.

- FURUHATA K., DENO S., SAKAMOTO M. (1997) Immobilization of alkaline phosphatase onto aminated silk fabrics, *J. Seric. Sci. Jpn.*, 66, 11-16.
- GAMOT., INOKUCHI T., LAUFER H. (1977) Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*, *Insect Biochem.*, 7, 285-295.
- GOHEEN S. C. & MATSON R. S. (1985) Purification of human serum gamma globulins by hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 326, 235-241.
- GOHEEN S. C. & ENGELHORN S. C. (1984) Hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography of proteins, *J. Chromatogr.*, 317, 55-65.
- HASHIMOTO T. (1991) Macroporous synthetic hydrophilic resin-based packings for the separation of biopolymers, *J. Chromatogr.*, 544, 249-255.
- HIROTSU T., NAKAJIMA S., KITAMURA A., MIZOGUCHI K., SUDA Y. (1988) Water-ethanol separation by pervaporation through silk fibroin membranes, *Sen-i Gakkaishi*, 44, 72-77.
- HUANG J. X. & GUIOCHON G. (1989) Applications of preparative high-performance liquid chromatography to the separation and purification of peptides and proteins, *J. Chromatogr.*, 492, 431-469.
- HUZUKA E. & YANG J. T. (1968) The disordered and β conformations of silk fibroin in solution, *Biochemistry*, 7, 2218-2228.
- HUZUKA E. (1985) Silk thread. Mechanism of the spinning and physical properties, *Proc. 7th Int. Wool Text. Res. Conf.*, Tokyo, 1, 319-328.
- ISHIKAWA E. & SUZUKI Y. (1985) Tissue and stage-specific expression of sericin genes in the middle silk gland of *Bombyx mori*, *Develop. Growth and Differ.*, 27, 73-82.
- KAPLAND D. L., LOMBARDI S. J., MULLER W. S., FOSSEY S. A. (1991) Biomaterials. Novel materials from biological sources, 1-53, D. Byrom Ed., Macmillan Publishers Ltd., N. Y.
- KATO Y., KITAMURA T., HASHIMOTO T. (1984a) New support for hydrophobic interaction chromatography of proteins, *J. Chromatogr.*, 292, 418-426.
- KATO Y., KITAMURA T., HASHIMOTO T. (1984b) Operational variables in high-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins on TSK-gel Phenyl-5PW, *J. Chromatogr.*, 298, 407-418.
- KATO Y., KITAMURA T., HASHIMOTO T. (1985) Preparative high-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins on TSK-gel Phenyl-5PW, *J. Chromatogr.*, 333, 202-210.
- KENNEDY R. M. (1990) Hydrophobic chromatography, *Methods in Enzymology*, 182, 339-343.
- LUCAS F., SHAW J. T. B., SMITH S. G. (1958) The silk fibroins, *Adv. Prot. Chem.*, 13, 107-242.
- MELANDER W. & HORVATH C. (1977) Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series, *Arch. Biochem. Biophys.*, 183, 200-215.
- MICHAÏLLE J.-J., GAREL A., PRUDHOMME J.-C. (1988) The sericin I gene encodes several sequences rich in serine codons, *Sericologia*, 28(1), 16-20.
- MICHAÏLLE J.-J., GAREL A., PRUDHOMME J.-C. (1989) The expression of five middle silk gland specific genes is territorially regulated during the larval development of *Bombyx mori*, *Insect Biochem.*, 19, 19-27.
- MINOURA N., TSUKUDA M., NAGURA M. (1990) Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial, *Biomaterials*, 11, 430-434.
- PAVLU B., JOHANSSON U., NYHLEN C., WICHMANN A. (1986) Rapid purification of monoclonal antibodies by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 359, 449-460.
- SHIMURA K., KIKUCHI A., OHOTOMO K., KATAGATA Y., HYODO A., (1976) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. Fractionation of fibroin prepared from posterior silk gland, *J. Biochem.*, 80, 693-702.
- SHIMURA K., KIKUCHI A., OHOTOMO K., KATAGATA Y., (1982) Occurrence of small component proteins in the cocoon fibroin of *Bombyx mori*, *J. Seric. Sci. Jpn.*, 51, 20-26.
- SHIMURA K. (1988) The structure, synthesis and secretion of fibroin in the silkworm, *Bombyx mori*, *Sericologia*, 28(4), 451-479.

- SINOHARA H. (1979) Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*, Comp. Biochem. Physiol., 63B, 87-91.
- TAMADA Y., (1998) Modification of silk materials for developing new biomaterials, Proc. 2nd NISES/COE Int. Symp. on 'Development and applications of functional biomaterials', Misc. Publ. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., 23, 17-19.
- TANAKA K., MORI K., MIZUNO S. (1993) Immunological identification of the major disulphide-linked light component of silk fibroin, J. Biochem., 114, 1-4.
- TSUKADA M., FREDDI G., MINOURA N., ALLARA G. (1994) Preparation and application of porous silk fibroin materials, J. Appl. Polym. Sci., 54, 507-514.

FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DE LA SOIE (*BOMBYX MORI*) PAR DES TECHNIQUES DE PRECIPITATION ET CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE

G. FREDDI & G. ALLARA

1. Stazione Sperimentale per la Seta, via Giuseppe Colombo, 81, 20133 Milano, Italie.
2. Ratti Technologies, via Madonna, 30, 22070 Guanzate, Como, Italie.

*Les cocons de **Bombyx mori** ont été dissous avec 60 % de LiSCN et le mélange de protéines de soie a été fractionné en utilisant des techniques de précipitation classiques. Les fractions de protéines de soie obtenues sur précipitation au sulfate d'ammonium à 19 %, 30 % et 50 % ont été caractérisées au moyen d'une analyse des acides aminés et d'une chromatographie d'exclusion. Une contamination réciproque entre les chaînes de fibroïne H et L est observée. En baissant la concentration d'urée de 5 M à 2 M, les chaînes de fibroïne H et L co-précipitent à 19 % de sulfate d'ammonium. En utilisant le polyéthylène glycol comme agent de précipitation, les protéines de soie précipitent en une étape à forte concentration de polymère (> 35 % et > 40 % p/v pour du polyéthylène glycol (PEG) 400 et 4000 respectivement). On a appliqué la chromatographie à interaction hydrophobe au fractionnement d'une solution de protéines de soie. L'adsorption des protéines de soie au complexe HIC (TSK, gel Phényle, 5PW) est obtenue à une faible force ionique de sulfate d'ammonium < 0,5 M. Les protéines de soie sont ensuite éluées avec un gradient négatif de force ionique dans l'ordre suivant : sérécine, chaîne H et chaîne L de fibroïne. Les effets de divers paramètres, tels que la force ionique initiale, la pente du gradient, le pH de l'éluant, la concentration d'urée dans la phase mobile sur le comportement d'élué des protéines de soie ont été étudiés. Avec une force ionique initiale correspondant à $\leq 0,2$ % de sulfate d'ammonium et une pente de gradient de 0,025 M/ml, la sérécine et la fibroïne sont séparées de manière quantitative en une opération unique de chromatographie. Les changements de pH dans la gamme 7-9 influencent légèrement la rétention des protéines sans améliorer la résolution. La présence d'urée 5M dans la phase mobile affaiblit les interactions hydrophobes de la chaîne H de fibroïne avec la condensation HIC, ce qui entraîne une perte partielle de sélectivité. A partir des résultats obtenus, un protocole de fractionnement des protéines de la soie à l'échelle préparative peut être mis au point. Enfin, cinq polypeptides de sérécine se caractérisant par de faibles interactions hydrophobes avec le complexe HIC ont été isolés et leur composition en acides aminés a été déterminée.*

INTRODUCTION

Le fil de soie grège filé par le ver à soie *Bombyx mori* pour former son cocon à la fin de sa vie larvaire a une structure composite caractéristique de « gaine autour de deux fils ». Deux filaments continus de fibroïne sont entourés et collés ensemble par une gomme protéique appelée sérécine. La fibroïne de soie représente 75 - 83 % en poids de la soie grège, tandis que la sérécine varie de 17 % à 25 %, en fonction de la variété, de l'origine, des conditions d'élevage, etc... La sérécine est en général éliminée des fils ou des tissus de soie pendant la transformation textile au moyen de solutions savonneuses chaudes, de solutions d'alcali ou avec des enzymes. La fibroïne est synthétisée dans les cellules sécrétrices de la glande sérécigène postérieure et est formée d'un grand polypeptide appelé chaîne H, d'environ 350 kD (Shimura, 1988) et de deux sous-unités légères, la chaîne L (Shimura, 1988) et P25 (Chevillar et coll., 1986), d'un poids moléculaire d'environ 25 kD. Les chaînes H et L

sont liées par un pont disulfure (Shimura, 1988), tandis que P25 ne semble pas être liée par covalence à la chaîne H (Tanaka et coll., 1993). Le terme sérécine recouvre un mélange de protéines différant en composition et en taille, synthétisé dans la glande sérécigène moyenne (Gamo et coll., 1977 ; Ishikawa et Suzuki, 1985 ; Michaille et coll., 1988, 1989). Le poids moléculaire de ces protéines, se caractérisant par un contenu en sérine élevé, peut aller de 65 kD à 400 kD. On pense que la couche de sérécine du fil de soie contient de cinq à neuf polypeptides, dont certains sont glycosylés (Sinhara, 1979).

Pendant le filage de la soie par le ver, la solution de protéines concentrée stockée dans la glande subit une dénaturation mécanique progressive provoquée par des forces conjuguées d'éjection et de tiraillement exercés par le ver à soie, accompagnée par une grande perte en eau (Iizuka, 1985). La fibroïne et la sérécine deviennent insolubles, et prennent les propriétés physiques, chimiques et mécaniques caractéristiques qui sont hautement appréciées par les techniciens textiles et placent la soie en dehors des autres fibres naturelles et synthétiques (Kaplant et coll., 1991). En conséquence, la dissolution de la soie est une opération assez difficile, parce qu'elle nécessite le gonflement de la structure de la fibre compacte et la rupture des liaisons hydrogènes solides inter et intra moléculaires stabilisant la structure de la fibre. On peut arriver à une dissolution complète de la soie au moyen de solvants adaptés, comme les solutions concentrées de sels Li. Le LiSCN est préférable parce qu'il est actif à température ambiante, sa solution est neutre et il n'est pas susceptible de causer une hydrolyse de la liaison peptidique (Lucas et coll., 1958). Ensuite, on peut facilement préparer une solution tampon aqueuse par dialyse contre un solvant adapté.

Il peut être nécessaire de préparer des solutions aqueuses de soie à la fois dans un but analytique et préparatif.

Avoir une solution aqueuse stable est une condition préalable pour utiliser des techniques électrophorétiques et chromatographiques pour l'analyse des protéines de soie. Ces approches analytiques sont d'une importance primordiale pour la purification et la caractérisation des composants individuels des protéines de la soie naturelle, tout comme pour étudier l'effet de traitements physico-chimiques variés (tels que ceux auxquels la soie est soumise pendant sa transformation) sur l'intégrité de la fibre. D'autre part, la soie provoque un intérêt à la fois académique et technologique en tant que source de biopolymères aux propriétés fonctionnelles remarquables (Bunning et coll., 1994). La demande accrue en nouvelles matières aux fonctionnalités sélectionnées pour des applications dans les domaines biotechnologiques et bio-médicaux encourage un grand nombre d'études sur les polymères naturels, en particulier sur la soie. Les biodétecteurs obtenus par la technique d'immobilisation d'enzymes (Asakura et coll., 1992 ; Furuhashi et coll., 1997), les membranes à perméabilité sélective (Hirotsu et coll., 1988 ; Minoura et coll., 1990), les procédés biocompatibles pour une libération contrôlée d'un médicament (Tsukuda et coll., 1994) et ses fonctions cicatrisantes (Tamada, 1998) font partie des applications déjà conçues ou suggérées de la fibroïne de soie. La sérécine possède aussi un attrait, toutefois son utilisation est limitée par le fait qu'actuellement cette fraction protéique est récupérée dans l'eau contenant les déchets de décreusage, un procédé qui entraîne une importante dégradation de la structure physico-chimique des protéines. Pour cette raison, la sérécine est surtout utilisée sous forme d'hydrolysats comme additif aux cosmétiques.

La possibilité de solubilisation des déchets de soie grège et de fractionnement du mélange de protéines de soie au moyen de techniques chromatographiques à l'échelle préparative encouragerait certainement l'exploitation à la fois de la fibroïne et de la sérécine. Les cocons non-dévidables et différents types de déchets de soie peuvent être des matériaux de départ pour la préparation de la sérécine et de la fibroïne en vue d'applications non-textiles. De plus, les protéines de soie peuvent aussi être récupérées en tant que produits dérivés dans le cadre d'une opération biotechnologique qui utilise les vers à soie transgéniques pour la production d'une protéine d'intérêt. En supposant que cette protéine soit sécrétée par la glande sérécigène et incorporée dans le cocon, sa purification peut produire de grandes quantités de « déchets soyeux » dont le recyclage pourrait devenir une opération profitable, à condition que des protocoles de solubilisation et de fractionnement efficaces soient établis.

Après dissolution avec du LiSCN et une dialyse, les protéines de soie peuvent être fractionnées par les sels, ce qui consiste en la précipitation fractionnée par l'ajout de quantités croissantes d'un sel neutre (le sulfate d'ammonium) à la solution (Shimura et coll., 1976, 1982). Dans l'étude actuelle, cette méthode de fractionnement classique a été révisée et l'on a fait des recherches sur l'influence de la concentration d'urée sur la précipitation de protéines. Ces méthodes prenant du temps et ayant un faible pouvoir séparateur, nous avons employé des techniques de chromatographie modernes pour réaliser le fractionnement de la soie, en particulier la chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC). Cette méthode nous est rapidement apparue prometteuse quant à notre but parce que le mécanisme de rétention se caractérise par une spécificité élevée, et le procédé d'adsorption-désorption des protéines est activé par les mêmes forces que le relargage (Melander et Horvath, 1977). De plus, grâce aux faibles interactions entre les molécules protéiques et le matériel de condensation des colonnes et à l'utilisation de tampons aqueux, l'activité biologique d'une protéine d'un éventuel intérêt mélangée aux protéines de soie pourrait probablement être préservée.

MATERIELS ET METHODES

Des coques soyeuses nouvellement formées ont été dégraissées avec de l'éther diéthylique. Les couches ont été séparées manuellement, coupées en petits bouts, et dissoutes avec 20 volumes de LiSCN à 60 %. Une dissolution complète a été obtenue en 90 minutes à environ 40 ° C, en agitant légèrement. La solution a ensuite été dialysée contre un tampon 20mM Tris-HCl (pH 8) contenant 2 M ou 5 M d'urée.

La réduction et la carboxyméthylation ont été réalisées en suivant la méthode de Shimura et coll., (1976). Les fractions de protéines soyeuses sont préparées par précipitation fractionnée avec du sulfate d'ammonium à 19 %, 30 % et 50 % (p/v). Les précipités sont recueillis par centrifugation à 24000 g pendant 30 min et lyophilisés. Pour les analyses chromatographiques les précipités sont dissous avec du LiSCN à 60 % et dialysés contre le tampon de la phase mobile.

Les tests de précipitation avec le polyéthylène glycol (PEG 400 et PEG 4000, Merck) sont réalisés en ajoutant la quantité requise de polymère à une solution tampon de protéines de soie, la concentration PEG finale étant comprise entre 5 et 50 % (p/v). Après 1 heure à 0°C, les échantillons sont centrifugés à 24000 g pendant 30 minutes. La concentration de protéines dans le surnageant est déterminée de manière spectrophométrique à 274 nm ($A_{1\%, 1\text{ cm}} = 11,3$, Iizuka et Yang, 1968).

Les analyses de chromatographie d'exclusion (SEC) sont réalisées sur une colonne de verre de 60 × 1 cm remplie avec du Fractogel TSK HW 65 (Merck), à une vitesse d'élution de 1 ml/min, en utilisant un tampon 20mM Tris-HCl (pH 8) avec 5 M d'urée et 0,1 M KCl en phase mobile. L'éluat est détecté à 274 nm.

Les analyses de chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC) sont réalisées sur une colonne de gel TSK 5PW Phényle (LKB) de 7,5 × 0,75 cm à une vitesse d'élution de 1 ml/min. La phase mobile de départ est un tampon Tris-HCl de 20mM (pH 8) contenant 2 M d'urée et 0,5 M de sulfate d'ammonium. Les protéines sont éluées avec un gradient négatif de sulfate d'ammonium de 0,5M à 0M, et détectée à 225 et 274 nm.

La composition en acides aminés est déterminée après une hydrolyse acide à 105° C pendant 24 heures sous vide. Les résidus d'acides aminés libres ont été dérivés avec du phenyl isothio-cyanate (Sigma) et élués sur une colonne en phase inversée de 30 × 0,39 cm (Picotag, Waters) à une vitesse d'élution de 1 ml/min. L'éluat est détecté à 254 nm. La composition quantitative en acides aminés a été déterminée par calibration externe standard (Acide Aminé Standard H. Pierce).

RESULTATS ET DISCUSSION

Fractionnement des protéines de soie par les techniques de précipitation :

La précipitation sélective des protéines par l'ajout de concentrations élevées de sels neutres (habituellement du sulfate d'ammonium) ou non-ioniques, des polymères solubles à l'eau

(polyéthylène glycol) est une technique de fractionnement classique utilisée à des fins préparatives dans les premières phases de programmes de purification des protéines. Bien que ces techniques aient un faible pouvoir séparateur, leur but est de concentrer, clarifier et purifier les extraits de protéines brutes pour les étapes suivantes de purification.

Précipitation avec du sulfate d'ammonium :

Shimura et coll., (1982) ont mis au point un protocole pour le fractionnement des protéines de soie des cocons par précipitation avec 19 %, 30 % et 50 % de sulfate d'ammonium. Le même procédé de fractionnement a été appliqué dans cette étude à une solution de protéines de soie réduites carboxyméthylées dans un tampon de 20mM Tris-HCl (pH 8) contenant 5 M d'urée. Le tableau I présente les résultats de composition en acides aminés des fractions recueillies après chaque stade de précipitation, ainsi qu'une évaluation semi-quantitative du rendement en protéines. Le précipité de 19 % a une composition en acides aminés que l'on peut rapporter à la chaîne de fibroïne L. Comme il sera montré plus loin, la petite sous-unité de fibroïne est le principal composant de cette fraction. Le précipité de 30 % correspond clairement à la chaîne H de fibroïne, comme le montre la teneur élevée caractéristique en glycine, alanine, sérine et tyrosine, dont les concentrations représentent environ 93 % (mol) de l'ensemble des résidus en acides aminés. Le rapport entre la quantité de protéines recouvrée à 19 % et 30 % de sulfate d'ammonium est de 9:91, indiquant un rapport moléculaire de 1:1 entre les chaînes de fibroïne de soie légères et lourdes (Shimura, 1988). Le mélange de protéines précipité à 50 % de sulfate d'ammonium peut être attribué à la sérécine de soie, comme l'indique sa teneur élevée en sérine.

Bien que chacune des fractions ci-dessus semble correspondre à un composant de protéine de soie bien défini, on doit s'attendre à un certain degré de contamination, à cause de la faible résolution de la méthode de fractionnement. L'analyse SEC des précipités de sulfate d'ammonium (Fig. 1) confirme cette hypothèse. La fraction à 19 % présente un pic majeur dans la zone de poids moléculaire bas (chaîne de fibroïne L) précédé par un pic large et faible à des poids moléculaire plus élevés. Ce dernier a été recueilli et à partir de sa composition en acides aminés il a été possible d'attribuer ces protéines aux composants de sérécine avec une teneur en sérine élevée d'environ 20 % mol. Le précipité à 30 % présente un pic intense centré à environ 350 kD (chaîne H de fibroïne), suivi par un pic de faible poids moléculaire apparaissant à la queue du pic majeur. La composition en acides aminés de la fraction chromatographique correspondant au petit pic d'épaule est similaire à celle de la sous-unité de la chaîne L de fibroïne de soie. Ces résultats impliquent que, dans nos conditions expérimentales, la chaîne L de fibroïne n'a pas été complètement précipitée à 19 % de sulfate d'ammonium et qu'il aurait fallu de légers ajustements de la concentration en sel pour optimiser la récupération de cette fraction protéique.

Le comportement chromatographique du précipité à 50 % est caractérisé par la présence de fractions de protéines couvrant la zone entière de fractionnement de la colonne, avec une prédominance de protéines à poids moléculaires de faible à moyen. De manière à caractériser les composants de sérécine présents dans le précipité à 50 %, des sous-fractions d'éluat d'1 ml ont été recueillies et leur composition en acides aminés a été déterminée. Le tableau II présente le profil en acides aminés de trois sous-fractions représentatives des trois principaux composants de la sérécine identifiés dans le précipité. Ils peuvent être classifiés comme des sérécines « élevées », « moyennes » et « faibles en sérine », avec une teneur en sérine de 33-36 mol %, 22-27 mol % et 13-18 mol %, respectivement. Il est intéressant de noter que plus le poids moléculaire est élevé, plus la concentration en sérine est élevée, ce qui confirme les résultats de Gamo et coll. (1977), qui ont trouvé que les sérécines riches en sérine avaient des poids moléculaires compris entre 200 kD et 400 kD. D'autre part, les sérécines à poids moléculaire faible se caractérisent par une faible teneur en sérine. Ces résultats prouvent la variabilité du poids moléculaire et de la composition en acides aminés des sérécines de soie. D'autres fractions de sérécine demeurent dans le surnageant après précipitation avec du sulfate d'ammonium à 50 %. Des renseignements sur ces polypeptides seront donnés dans le dernier paragraphe. Il est bon de noter que certaines des fractions ci-dessus présentent des concentrations en

glycine et en alanine plus élevées à ce qu'on peut attendre pour des sérécines. Elles peuvent être attribuées à la contamination par des polypeptides de fibroïne co-précipitant avec les sérécines.

L'effet de la concentration d'urée sur le relarguage des protéines de soie vaudrait des discussions supplémentaires. L'ajout de hautes concentrations de sels neutres (kosmotropes) à une solution de protéines provoque la précipitation des protéines par la perturbation de l'interaction solvant-protéine. En tant que chaotrope, l'urée tend à contrer l'effet du sel. Dans le protocole de fractionnement de Shimura et coll. (1982) l'équilibre entre la quantité d'urée présente dans le milieu tampon (5 M) et la quantité de sulfate d'ammonium ajoutée à la solution de protéine de soies provoque la précipitation de fibroïne et de sérécines dans l'ordre discuté ci-dessus. Une baisse de la concentration d'urée peut entraîner des changements dans le mode de précipitation de la soie. Pour vérifier cette hypothèse, l'urée a été baissée de 5 M à 2 M, tandis que l'on garde les étapes d'ajout de sulfate d'ammonium constantes. D'après les résultats de la composition en acides aminés et le rendement en protéines (Tableau III) il a été possible d'observer que le précipité à 19 % est formé à la fois par des chaînes de fibroïne L et II, comme le confirme l'analyse SEC (chromatogramme non présenté). Le précipité à 30 % est négligeable, tandis que le précipité à 50 % contient des fractions de sérécine avec une concentration moyenne en sérine plus élevée que celle de la fraction correspondante recouvrée dans le système tampon à 5 M d'urée. Ces résultats indiquent que le comportement de précipitation des protéines de soie est influencé de manière très marquée par le changement de la concentration en urée et que le paramètre peut être utilisé pour moduler l'opération de fractionnement de manière à répondre à différents besoins analytiques et/ou de process. En particulier, une baisse de l'urée de 5 M à 2 M permet de séparer la fibroïne de la sérécine en une étape, à une concentration en sel relativement faible (19 %). Cela peut être considéré comme une approche intéressante pour la séparation des deux principaux composants de la soie à partir d'une solution obtenue en dissolvant de la soie grège (cocons indévidables, déchets de soie, etc...) et pour l'utilisation consécutive de ces biopolymères pour des applications textiles et non-textiles.

Précipitation avec du polyéthylène glycol:

L'utilisation de polymères non-ioniques, solubles dans l'eau, tels que les PEG, pour la précipitation fractionnée des protéines a été décrite pour divers mélanges complexes de protéines, mais non pas pour les protéines de la soie. Les avantages des PEG comme agent de précipitation fractionné consistent essentiellement en leur faible tendance à dénaturer ou à interagir avec les protéines. Le mécanisme de précipitation des protéines peut être expliqué de manière qualitative à partir d'une opération d'exclusion stérique, par laquelle les protéines se concentrent dans l'espace extra-polymère, dépassant ainsi leur limite de solubilité. Le poids moléculaire PEG et la concentration d'une part, les dimensions des protéines de l'autre semblent être les principaux paramètres influençant le comportement de précipitation.

Deux types de PEG au poids moléculaire de 400 D et 4000 D ont été utilisés pour nos tests de fractionnement. Des quantités croissantes de PEG dans la gamme de concentrations 5-50 % (w/v) sont ajoutées à une solution de protéines de soie dans un tampon à 20mM Tris-HCl (pH 8) avec 2 M d'urée. Le comportement de solubilité des protéines en fonction de la concentration PEG croissante montre qu'aucune précipitation ne se produit à des concentrations de polymères faibles à moyennes. La quantité de polymères nécessaire pour précipiter les protéines de soie est très élevée (> 35 % et > 40 % pour les PEG 400 et les PEG 4000 respectivement). De plus, la précipitation se produit probablement en une étape, c'est à dire que l'ensemble des protéines de soie ou la plus grande partie précipite au même moment comme le prouve la baisse importante de la courbe de solubilité. La viscosité extrêmement élevée de la solution rend difficile l'approfondissement de la cinétique de la précipitation des protéines de soie. Pour cette raison, tout comme pour les problèmes provenant du besoin de retirer une telle quantité de PEG, cette méthode de précipitation n'est pas jugée adaptée au fractionnement des protéines de soie au stade initial.

Chromatographie par interaction hydrophobe (HIC) des protéines de soie :

L'introduction de l'HIC remonte au début des années 1970 ; elle est rapidement devenue une technique de chromatographie populaire à la fois pour des applications analytiques et de préparation. Le mécanisme de séparation utilisé pour l'HIC repose sur l'utilisation de faibles interactions hydrophobes qui ont lieu entre les protéines et une phase stationnaire. Cette dernière peut être une matrice organique (agarose, polymères synthétiques divers) ou inorganique (silice) auxquels les ligands hydrophobes (tels que les groupes méthyle, propyle, butyle, phényle) sont liés. Dans l'HIC, les interactions entre les protéines et les ligands sont promues par une phase mobile de force ionique élevée et ensuite les protéines sont désorbées par un gradient négatif de force ionique. La sélectivité dans l'HIC peut être facilement manipulée par des variables de la phase mobile et de la phase stationnaire. Pour la première on peut modifier le type de sel, la concentration et le pH, pour la seconde la longueur, la densité et l'hydrophobicité de la chaîne du ligand.

Il y a de nombreuses similarités dans les forces impliquées à la fois dans l'adsorption d'une protéine pendant la phase stationnaire HIC et le procédé de précipitation saline. Melander et Horvath (1977) ont montré que l'augmentation de la tension de surface de l'eau induite par le sel facilite les contacts protéine-protéine dans la précipitation saline et les contacts protéine-ligand dans l'HIC. Les protéines sont censées être éluées à partir d'une colonne HIC dans l'ordre opposé relatif à leur précipitation par le sel. Dans nos tests, le sulfate d'ammonium a été utilisé pour promouvoir la liaison protéique en phase stationnaire. Le contenu de la colonne est une résine de gel-TSK phényl-5PW, un polymère hydrophile macroporesynthétique (taille de pore 500-1000 Å, diamètre de particule de 10µm), avec des ligands phényle (densité : 100 µmol/ml). Cette colonne HIC, caractérisée par une bonne stabilité mécanique et chimique, une capacité d'adsorption élevée pour les grandes molécules et une hydrophobie assez élevée, a été largement étudiée (Kato et coll., 1984a ; Hashimoto, 1991). De nombreux protocoles de purification de protéines ont été mis au point sur ce support à la fois dans des buts analytiques (Goheen et Matson, 1985 ; Pavlu et coll., 1986) et préparatifs (Kato et coll., 1985 ; Huang et Guiochon, 1989).

Analyses isocratiques :

Pour étudier l'effet de la force ionique sur l'adsorption des protéines de soie en phase stationnaire, les échantillons de protéines ont été élués de manière isocratique à des concentrations de sel croissantes en utilisant un tampon 20mM Tris-HCl (pH 8) avec 2 M d'urée en phase mobile (Fig. 2). En l'absence de sulfate d'ammonium les protéines de soie sont éluées au front du solvant. Aucune interaction n'a été établie entre les protéines et la phase stationnaire, dont le fonctionnement se fait purement sur le mode d'exclusion par la taille. L'absence de séparation entre les composants de protéines de soie de tailles moléculaires différentes est en grande partie due à la porosité de la résine, qui ne permet pas une perméation sélective. En augmentant progressivement la concentration de sel dans la phase mobile jusqu'à 0,5 M, la quantité de protéines retenue augmente. Elles sont seulement éluées par la phase mobile avec la force ionique la plus faible (0 M de sel). En traçant la surface du pic retenu en fonction de la concentration de sulfate d'ammonium (Fig. 3), on peut observer que la rétention protéique se produit à travers des étapes discrètes. Cela signifie que les différentes fractions protéiques de soie pourraient établir des interactions sélectives avec la phase stationnaire HIC, en fonction de leur structure (hydrophobie de surface) et de la composition de la phase mobile. Il est intéressant de noter que l'adsorption des protéines de soie avec le contenu de la colonne HIC est promue à une force ionique faible, bien inférieure à celle avec laquelle les colonnes HIC fonctionnent habituellement (Kennedy, 1990).

Analyses en gradient :

Le résultat des analyses isocratiques a permis de mettre au point un protocole pour l'éluion d'un extrait de protéine de soie brut sur la colonne de gel TSK Phényl-5PW. Les interactions avec la phase stationnaire sont initialisées au moyen d'une phase mobile initiale contenant 0,5 M de sulfate d'ammonium. Ensuite, les protéines sont éluées avec un gradient négatif de force ionique de 0,5 M à

0 M de sel. La figure 4 montre le profil d'élution obtenu avec un gradient de 20 min ($\Delta[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 0,025 \text{ M/ml}$), suivie par une étape finale isocratique de 20 min pour s'assurer d'une élution complète des fractions de protéines les plus fortement retenues. Les traits principaux consistent en une série de pics d'intensité moyenne (I) élués dans les 10 min suivant l'injection, suivis par des pics divers à élution large (II), qui précèdent le pic chromatographique le plus fort (III) apparaissant environ 21 min après l'injection. Finalement, un pic mineur mais bien séparé (IV) est élué à la 24ème min dans des conditions presque isocratiques. Etant donné que l'on peut s'attendre à ce que les protéines de soie soient éluées à partir de la colonne HIC dans l'ordre inverse par rapport à la séquence de précipitation avec le sulfate d'ammonium, les fractions I et II devraient correspondre aux sérécines, et les fractions III et IV aux chaînes H et L de fibroïne respectivement. L'hypothèse a été confirmée par l'analyse des fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium.

Pour optimiser l'élution des protéines de soie sur la colonne HIC, on a étudié l'effet de divers paramètres sur le mode d'élution. En augmentant la pente du gradient de 0,0125 M/ml à 0,5 M/ml on observe une perte progressive de résolution (Fig. 5). Un changement de la force ionique de la phase mobile correspondant à une baisse de la concentration de sulfate d'ammonium à 0,025 M/ml pourrait être considéré comme un bon compromis entre la résolution et la longueur totale de l'opération chromatographique.

L'influence de la concentration initiale en sel sur le profil d'élution a aussi été étudié. Des phases mobiles initiales différentes avec des concentrations en sel comprises entre 0,5 M et 0,15 M ont été testées, la pente du gradient étant constante (0,025 M/ml). Les pics I et II ont tendance à se fondre à une concentration initiale en sel $< 0,25 \text{ M}$ (Fig. 6), ce qui suggère que les polypeptides de sérécine migrent plus vite le long de la colonne. De même, l'intensité du pic III baisse, tandis que le pic IV n'est presque pas touché. A 0,15 M de sel, le rapport d'intensité entre les pics (I+II) et (III+IV) est d'environ 25:75, ce qui correspond en gros au rapport quantitatif entre la sérécine et les chaînes de fibroïne H et L des cocons. L'identité des fractions est confirmée par l'analyse en acides aminés. Ces observations, non seulement montrent que la rétention des protéines de soie sur la colonne HIC peut être facilement modulée en changeant la composition de la phase mobile, mais aussi que les fractions de protéines de soie les plus importantes peuvent être fractionnées en une opération chromatographique unique, plutôt que de réaliser l'opération de précipitation qui prend du temps.

Il a été rapporté que le pH de la phase mobile pourrait influencer indirectement la rétention de protéines dans une phase stationnaire HIC en changeant l'état de ionisation de résidus d'acides aminés chargés situés à la surface de la molécule (Kennedy, 1990) et que de légers changements du pH de l'éluant peuvent être exploités comme un instrument permettant d'ajuster la sélectivité et d'optimiser la résolution entre les différents composants du mélange de protéines à fractionner. Une baisse du pH dans la phase mobile entraîne une augmentation de la rétention des protéines, bien que différents systèmes de protéines en phase stationnaire peuvent se comporter de manière différente. Les variations des pics chromatographiques dans la zone 5-8 peuvent être dues à des changements de l'état de ionisation des résidus histidines de surface. L'effet du pH sur les protéines de soie a été étudié dans la zone 7-9. Les temps de rétention baissent légèrement à un pH de 9, et augmentent à un pH de 7, sans améliorer de manière significative la résolution. Les changements marginaux observés dans la rétention des protéines de soie permettent de conclure qu'un pH de 8 en phase mobile peut être considéré comme une valeur optimum pour l'élution des protéines de soie sur HIC.

L'urée est un composant important du système solvant utilisé pour les protéines de soie parce qu'il donne assez de stabilité à la solution pour permettre son analyse consécutive. Cependant, on suppose que la présence d'urée dans la phase mobile influence les interactions des protéines avec la phase stationnaire en renforçant la désorption des protéines (Goheen et Engelhorn, 1984 ; Kato et coll., 1984b). Pour étudier l'effet de l'urée sur le profil d'élution des protéines de soie, des échantillons ont été élués avec une phase mobile contenant de l'urée 5M et des quantités variables de sulfate d'ammonium (0,5 - 0,1 M). Les résultats montrent que l'intensité du pic I (protéines légèrement retenues) augmente alors que la concentration initiale en sel baisse. Un exemple de ce comportement est présenté dans la Figure 7. Les fractions correspondant aux trois pics majeurs sont recueillies et

élucées avec une phase mobile contenant de l'urée 2 M. Les résultats montrent que le pic faiblement retenu contient non seulement des sérícines mais aussi la chaîne H de fibroïne. Ces observations confirment le fait que les concentrations élevées d'urée dans la phase mobile affaiblissent les interactions hydrophobes de la chaîne H de fibroïne avec le complexe HIC, ce qui entraîne une perte partielle de sélectivité. Ainsi pour la mise au point d'un protocole efficace de fractionnement des protéines de soie par HIC, les concentrations de sel et d'urée doivent être correctement ajustées, en prenant en compte à la fois l'hydrophobie de la phase stationnaire et des protéines. Pour le gel TSK Phényle -5PW une phase mobile contenant de l'urée 2 M permet une bonne solubilité des protéines et minimise la liaison irréversible des protéines, sans affecter la sélectivité de la phase stationnaire.

Composition en acides aminés de certains polypeptides de sérícine :

La solution de protéines de soie préparée en dissolvant les cocons contient des polypeptides faiblement retenus en phase stationnaire HIC, qui en général sont élués dans les 10 min suivant l'injection (voir Fig. 4). Les mêmes pics sont détectés en analysant le surnageant après la précipitation avec 50 % de sulfate d'ammonium (Fig. 8). Bien que faiblement retenus, la nature de leurs interaction avec la phase stationnaire est surtout de type hydrophobe (Fausnaugh et Regnier, 1986), comme le montre la relation linéaire entre le facteur de capacité du pic et la concentration en sulfate d'ammonium (Fig. 9). Une des caractéristiques de ces pics est de présenter une réponse spectrophométrique à 225 nm comparativement plus élevée qu'à 274 nm. Ce fait, tout comme leur faible hydrophobie suggère que ces polypeptides peuvent appartenir à la fraction glycosylée de sérícine de soie. En utilisant une phase mobile initiale avec 1,6 M de sulfate d'ammonium cinq pics au moins ont été séparés, trois d'entre eux étant faiblement résolus (Fig. 8). Les fractions correspondant aux trois pics ci-dessus ont été recueillies et leur composition en acides aminés a été déterminée (Tableau IV). Les pics 1-3 présentent la composition caractéristique en acides aminés de la sérícine de soie. D'après la teneur élevée en sérine, ces polypeptides semblent correspondre à la fraction S3 isolée par Gamo et coll., (1977) de la glande sérícigène. Les pics 4 et 5 se caractérisent par une teneur en sérine plus faible et pourraient être apparentés à la fraction de sérícine S5 de Gamo et coll., (1977).

CONCLUSIONS

Les résultats rapportés dans cette étude montrent que la chromatographie d'interaction hydrophobe peut être employée avec succès pour le fractionnement des solutions de protéines de soie. L'adsorption des protéines de soie sur HIC est promue à une force ionique très faible ($\leq 0,5$ M de sulfate d'ammonium) bien inférieure à celle utilisée pour induire les interactions hydrophobes des protéines globulaires. Seuls quelques polypeptides de sérícine n'ont pas été retenus dans ces conditions. En baissant la force ionique, les protéines de soie sont éluées dans l'ordre suivant : sérícines, chaîne H et chaîne L de fibroïne. Une concentration d'urée > 2 M dans la phase mobile interfère avec la rétention des protéines, en agissant comme un agent de désorption.

A partir des résultats obtenus, un protocole de fractionnement d'un extrait de protéine brute pourrait comprendre les étapes suivantes : (a) solubilisation des protéines de soie au moyen de LiSCN (ou de LiBr), suivie par une dialyse contre un tampon adapté ; (b) chargement du mélange de protéines sur une colonne HIC à une force ionique modérée ($\leq 0,5$ M de sulfate d'ammonium) ; (c) élution séquentielle des polypeptides de sérícine et de fibroïne en diminuant progressivement la force ionique. Cette procédure est censée produire des fractions de protéines hautement enrichies en sérícine et en fibroïne en une opération chromatographique unique, évitant la longue opération de précipitation. Finalement, on pourrait facilement mettre au point des applications à échelle préparative ou de process à partir des résultats obtenus au laboratoire.

PEELING FORCE AS AN ALTERNATIVE FOR THE DETERMINATION OF COHESION IN SILK YARN

R. CHATTOPADHYAY*, SUBRATA DAS, M. L. GULRAJANI & KUSHAL SEN

Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology, Hauz-Khas, New Delhi - 110 016, India.

The force required to separate out the brins has been evaluated as a measure of cohesion of silk yarn. The peeling force has been found to correlate well with the values obtained on the Duplan Cohesion Tester. The inherent objectivity of this test enhances the reliability of the data. The influence of sericin content on cohesion has also been investigated.

Keywords: Brin, cohesion, duplan, fraying, peeling force, sericin.

INTRODUCTION

Cohesion is one of the most important property of silk. A strong cohesive thread can, not only withstand stresses and strain of weaving process leading to less end breaks but also enhance downstream processability of the yarn by reducing fraying and entanglements. Cohesion is, therefore a highly desirable feature in silk yarn. Determination of magnitude of cohesion is therefore important not only for routine quality control purposes but also for predicting the performance of various types of yarn.

Duplan Cohesion tester is a well known instrument for the assessment of cohesion. It works on the principle of applying several strokes on a bed of silk threads held under tension till fraying appears (i. e. open places of 6 mm or more) at 10 different locations (IS: 2948, 1964). Strokes are applied 10 at a time to check whether open places are visible or not. If the number of open place is less than 10, then another set of 10 strokes is applied. Such a method though simple and fast suffers from certain shortcomings, such as:

(i) Strokes are so applied that axial stress act on the yarn causing filaments to separate out. In actual practice, axial stress may not be the only reason for filament separation.

(ii) Manual counting of the number and size of open places is not only monotonous but laborious too and hence, may lead to erroneous results.

(iii) Since strokes are given 10 at a time, invariably the number of frayed portions are more than 10, when the test is stopped. Hence, the end point determination is ambiguous in nature.

(iv) The yarn is considered to have been frayed at a particular location if the opening is 6 mm or more in length. In actual practice, the length is not measured. The results therefore, depend more on the judgement of the person performing the test and therefore liable to be subjective.

Hence there appears a need for developing an alternate method which is free not only from subjective errors, but also much more sensitive and reliable for scientific investigations. Since sericin present in brin acts as a binder and holds the brins together, the force of attachment between brins can be a criteria to judge cohesion. The following investigation reports on cohesion based on above mentioned criteria.

* To whom the correspondence should be addressed.

MATERIALS AND METHODS

Materials:

Indian and imported tussah and mulberry silk yarns were used for the experiments. The specifications of different varieties of yarns are given in Table I.

Experimental methods:

The experimental samples were conditioned in a standard atmosphere at $65 \pm 2\%$ relative humidity and $27 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature for 24 h.

Determination of residual sericin:

Cohesion in the silk yarn is mainly due to residual sericin. To estimate the content of sericin, leas of silk yarn were first weighed (W_1), and degummed in a solution of 25% Marseille soap for 90 minutes at boil keeping a liquor ratio of 50:1. The leas were taken out, thoroughly washed and dried. The weights (W_2) of the degummed leas were recorded again after conditioning for 24 h in standard atmosphere. The residual sericin content was calculated as:

$$\text{Residual Sericin Content (\%)} = (W_1 - W_2 / W_1) \times 100$$

Determination of cohesion on Duplan cohesion tester:

Cohesion (strokes) of experimental samples was determined on Duplan cohesion Tester as per the standard procedure (IS: 2948, 1964). The silk yarn was passed over a set of 10 hooks on each side of the frame, under a uniform constant total tension of 180 g, in such a way that the thread is subjected to strokes at 20 different places simultaneously, at the rate of 140 strokes/min. The strokes needed to produce 10 open places of at least 6 mm length was recorded after repeatedly stopping the instrument. At least 30 observations were taken for each sample and a total length of 3.6 m was tested for each observation.

Determination of peeling force:

Since baves in a silk yarn remain stuck to each other due to the presence of sericin on their surfaces, a true estimate of cohesive force will be available if the baves are peeled out, i.e. separated from each other. The force needed to peel the baves can be taken as a reliable estimate of cohesion. To accomplish this, a section of silk yarn was randomly selected and cut by scissors. Baves from one of its end were separated into two equal parts. Each part was then gripped in the jaws of the Instron Tensile Tester (4201) set at a distance of 1 cm and moved so as to peel the yarn. The testing condition used for this test were:

Cross-head speed	- 50 cm/min
Scan length	- 5 cm
Gauge length	- 1 cm

The force required to peel off 5 cm of yarn was recorded. At least 30 observations were taken for each variety of silk yarn.

Effect of sericin on peeling force:

To study the relationship between sericin content and peeling force, tussah yarn (type c) was selected. It contained maximum sericin (7.8%) among all the tussah silk yarns.

The yarn was degummed at boil with 25 % Marseilles soap keeping a liquor ratio of 50:1. The duration of treatment was varied from 5 minutes to 125 minutes to produce samples left with different amount of residual sericin. The yarn samples were subsequently tested on Instron to determine the peeling force.

RESULTS AND DISCUSSION

Cohesion determined by Duplan cohesion tester and peeling force :

The primary source of cohesion is the presence of residual sericin. Besides sericin, the cohesion would also depend upon the nature of sericin, and total available surface area of baves mutually in contact. The available surface area in turn is decided by the number of baves in yarn cross-section and its fineness and cross-sectional shape. Finer and more baves in a yarn of given filament size will enhance potential surface area of contact and cohesion. The actual area of contact will however depend upon cross-sectional shape of baves too. Assuming baves to be randomly distributed in the yarn cross-section, it can be said that the more its cross-sectional shape deviates from circularity, the less

Table I. Structural characteristics of yarns*.*Tableau I. Caractéristiques structurelles des fils.*

Type of yarn	Yarn size (den)	Baves/Brin per cross-section
Type de fil	Diamètre du fil (den)	Baves/Brin par coupe
Tussah		
A	90.99	7/14
B	52.05	12/24
C	78.12	14/28
Mulberry / Mûrier		
D	19.17	7/14
E	20.07	7/14

* All yarns had no twist / *Aucun des fils n'est tordu*

Table II. Possible number of broken contact points.*Tableau II. Nombre probable de points de contact en rupture.*

Type of yarn	No. of baves/ brins in cross-section	No. of broken contact points
Type de fil	No. de baves/brin dans une coupe	No. de points de contact rompus
Tussah		
A	7/14	7, 9
B	12/24	9, 11
C	14/28	10, 11
Mulberry / Mûrier		
D	7/14	7, 9
E	7/14	7, 9

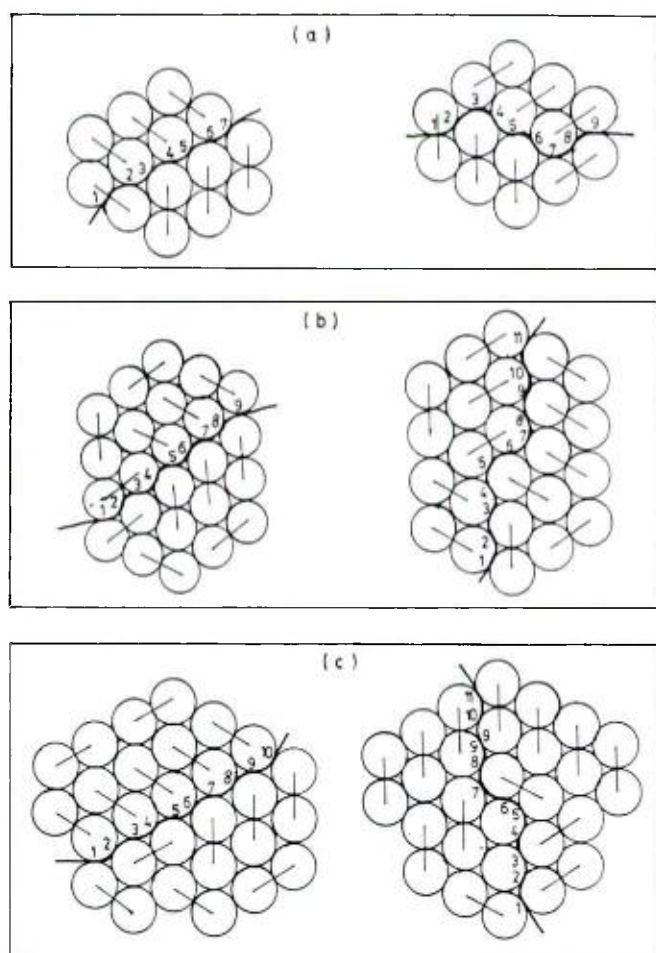


Fig 1. Schematic view of possible broken contact points indicated by numbers of silk brin during peeling.

1a. Number of broken contact points for 14 brins.

1b. Number of broken contact points for 24 brins.

1c. Number of broken contact points for 28 brins.

Fig 1. Vue schématique des points de contact rompus possibles indiqués par le nombre de brins de soie pendant l'épluchage.

1a. Nombre de points de contact rompus pour 14 brins.

1b. Nombre de points de contact rompus pour 24 brins.

1c. Nombre de points de contact rompus pour 28 brins.

would be the possible contact areas. This is so because fibre with non-circular cross-section will hinder close packing. Further when baves from a yarn are peeled out into two equal parts, groupwise bave separation takes place keeping mutual contact between baves within a group intact. Therefore all the contact points between baves are not likely to break. In the present case, since residual sericin content, yarn and brin fineness are different for all the yarns used in this study, a corresponding difference in cohesion and peeling force values would be obvious. Therefore a strict comparison between peeling force values of the yarns are not possible. For true comparison, peeling force values are to be normalized by finding out peeling force per unit surface area or peeling force per broken contact point.

Assuming circular cross-section it can be easily shown that the surface area of a filament (S) is $S \propto \sqrt{\text{den}}$ where denier is the fineness of the filament. Hence peeling force per unit surface area would be proportional to peeling force / number of bave $\times \sqrt{\text{den}}$, which was calculated from the known values of peeling force and filament fineness

Each bave consists of two brins. In extreme situation of packed structure a hexagonal close packed structure of baves as postulated by Schwarz (Schwarz, 1951) for circular fibres would be expected as

shown in Fig. 1 where each circle represents a brin and two adjacent circles inter connected by a line represent a bave. Though in actual case bave separation is most likely to occur, while calculating the broken contact points, the separated contacts between brins have been taken into consideration. Since the separation may take place along any arbitrary line in the cross-sectional plane of yarn as shown in Fig. 1, the possible number of actual broken contact points would vary and their number would be as given in Table II. From the values of broken contact points the peeling force per broken contact point was also calculated.

Cohesion data as obtained on Duplan cohesion tester and Instron tensile tester are presented in Table III. It shows that the highest value of cohesion is in mulberry silk type E followed by mulberry type D and tussah type C. No cohesion is observed for type A and type B tussah yarns. The peeling force, determined on Instron also shows a highest value for mulberry type E followed by tussah type C, mulberry type D and tussah type B and A. Peeling force therefore can discriminate between tussah

Table III. Cohesion and peeling force for various types of tussah and mulberry silk yarns.

Tableau III. Cohésion et force d'épluchage de différents types de fils de soie tussah et mûrier.

Type of yarn	Residual sericin (%)	Cohesion strokes (Duplan)	Peeling force		
			Absolute	Normalized with respect to	
				Area (g/ no. of baves × √den)	No. of broken contact points (g / contact point)
Type de fil	Séricine résiduelle %	Test de cohésion (Duplan)	Force d'épluchage		
			Absolue	Normalisée par rapport à	
				Surface (g / no de baves×√den)	No. de points de contact rompus (g / points de contact)
Tussah					
A	3.14	0.00	0.46	0.018	0.066 0.051
B	5.02	0.00	0.84	0.033	0.093 0.076
C	7.78	21.00	4.80	0.145	0.480 0.436
Mulberry					
Mûrier					
D	20.70	31.00	4.22	0.364	0.603 0.469
E	24.70	43.33	5.12	0.432	0.731 0.569

type A and B which Duplan cohesion tester fails to do. Low peeling force values are observed for type A and type B tussah yarns. A comparison in terms of normalized peeling force shows that cohesion increases in the order of tussah varieties type A, B and C and mulberry type D and E. The order between type C and D changes in comparison to the order obtained based on absolute peeling force and matches with that obtained by cohesion strokes. The grading in terms of normalised cohesion therefore remains identical to that obtained by cohesion strokes but becomes more sensitive. A high correlation coefficient between cohesion measured on Duplan and normalized peeling force with respect to area as well as number of separated contact points shown in Table IV also substantiate this fact. In general tussah yarns are less cohesive than mulberry yarns. One can further notice (Table III) that mulberry varieties of type E which contains highest residual sericin also exhibit highest cohesion and peeling force. A high level of sericin content, finer denier and triangular cross-section can be ascribed to this. Amongst tussah, type C shows highest values of cohesion and contain maximum amount of sericin also. Besides, it is finer and contains maximum number of brins as well. Cohesion strokes are almost zero for residual sericin level of 5% or below. Peeling force however shows a reasonable value, thus indicating its sensitiveness to the level of sericin. It appears therefore that residual sericin as well as its characteristics which is influenced by tussah variety, affect cohesion values.

Table IV. Correlations between cohesion strokes and peeling force for tussah and mulberry silk yarns.

Tableau IV. Corrélations entre la cohésion et la force d'épluchage pour les fils de soie tussah et mûrier.

Variables	Correlation coefficients	Estimated regression equation
<i>Variables</i>	<i>Coefficients de corrélation</i>	<i>Equation de régression estimée</i>
Cohesion stroke vs Absolute peeling force <i>Coups de cohésion en fonction de la force d'épluchage absolue</i>	0.92	$D = 7.836 \times P - 5.133$
Cohesion stroke vs Normalized peeling force / area <i>Coups de cohésion en fonction de la force d'épluchage normalisée / surface</i>	0.96	$D = 96.313 \times P - 0.100$
Cohesion stroke vs Normalized peeling force / contact point <i>Coups de cohésion en fonction de la force d'épluchage normalisée / point de contact</i>	0.99	$D = 69.747 \times P - 5.861$

D = Cohesion stroke on Duplan / *Cohésion sur Duplan*. P = Peeling force on Instron / *Force d'épluchage sur Instron*.

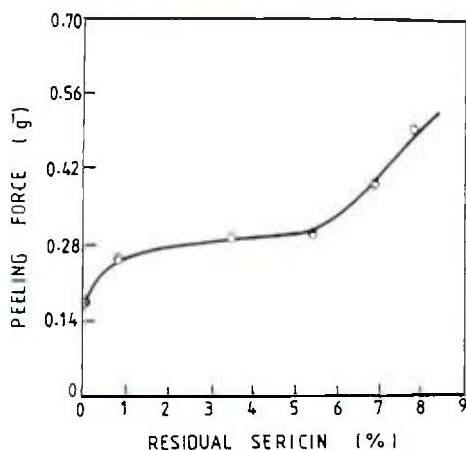


Fig. 2. Effect of residual sericin on peeling force for tussah type C.

Fig 2. Effet de la sérécine résiduelle sur la force d'épluchage pour le tussah de type C.

Residual sericin versus cohesion and peeling force:

To isolate the influence of only residual sericin on peeling force, the level of residual sericin in type C tussah yarn was varied through degumming for different duration of time. A plot between peeling force and residual sericin depicted in Fig 2 clearly brings out the fact that peeling force increases with the increase in residual sericin content, initially slowly but becomes too rapid beyond 5% level of sericin.

CONCLUSIONS

A strong correlation exists between normalized peeling force and cohesion strokes determined on Duplan. Peeling force increases rapidly with sericin especially at higher residual sericin content. The peeling force determined on Instron is much more sensitive to the change in cohesion values especially when the sericin content is low.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Central Silk Board, Bangalore, Ministry of Textiles, Govt. of India, for the financial support under National Sericulture Project to carry out the work.

REFERENCES

- ISI Test Method (1964) Handbook of Textile Testing, IS : 2948, 190.
- SCHWARZ E. R. (1951) Certain aspects of yarn structure. Text. Res. J. 21(3), 125

LA FORCE D'EPLUCHAGE COMME UNE ALTERNATIVE POUR LA DETERMINATION DE LA COHESION DU FIL DE SOIE

R. CHATTOPADHYAY*, SUBRATA DAS, M. L. GULRAJANI & KUSHAL SEN

Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology, Hauz-Khas, New Delhi - 110 016, Inde.

La force requise pour séparer les brins a été évaluée comme mesure de la cohésion du fil de soie. Il a été découvert que la force d'épluchage correspond bien aux valeurs obtenues sur l'appareil de contrôle de cohésion Duplan. L'objectivité propre de ce test augmente la fiabilité des données. L'influence du contenu en sérécine sur la cohésion a fait aussi l'objet de recherches.

INTRODUCTION

La cohésion est une des propriétés les plus importantes de la soie. Un fil solide et cohésif peut, non seulement résister aux pressions et à la tension du processus de tissage menant à moins de bouts cassés mais aussi améliorer le bon déroulement du fil en réduisant les effilochages et les emmêlements. La cohésion est, par conséquent, une caractéristique très souhaitable en ce qui concerne le fil de soie. La détermination de l'ampleur de la cohésion est ainsi importante non seulement pour le contrôle de qualité de routine mais aussi pour prévoir l'efficacité des divers types de fils.

L'appareil de contrôle de cohésion Duplan est un instrument bien connu pour l'évaluation de la cohésion. Son fonctionnement consiste à appliquer plusieurs coups sur un lit de fils de soie tenus sous tension jusqu'à ce qu'ils commencent à s'effiloquer (c'est-à-dire des endroits ouverts de 6 mm ou plus) dans 10 endroits différents (IS : 2948, 1964). Les coups sont appliqués par 10 en une fois pour vérifier si les endroits ouverts sont visibles ou non. Si le nombre d'endroits ouverts est inférieur à 10, un autre ensemble de 10 coups est appliqué. Une telle méthode bien que simple et rapide comporte certains défauts tels que :

1- L'application des coups fait qu'on obtient une tension axiale qui agit sur le fil en provoquant la séparation des filaments. Dans la pratique, la tension axiale n'est pas la seule cause de la séparation du filament.

2- Le compte manuel du nombre et de la taille des endroits ouverts n'est pas seulement monotone mais aussi laborieux, et par conséquent cela peut engendrer des résultats faux.

3- Etant donné que les coups sont donnés par 10 à la fois, invariablement le nombre des portions effilochées est supérieure à 10 quand l'expérience est terminée. Par conséquent, la détermination finale est ambiguë par nature.

4- Le fil est considéré comme effiloché à un endroit particulier si l'ouverture est de 6 mm ou plus de long. Dans la pratique, la longueur n'est pas mesurée. Donc les résultats dépendent plus du

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

jugement de la personne effectuant l'expérience, et par conséquent ces résultats sont susceptibles d'être subjectifs.

D'où le besoin de développer une méthode de remplacement qui est débarrassée non seulement des erreurs subjectives, mais aussi beaucoup plus sensible et fiable pour les recherches scientifiques. Puisque la sérécine présente dans le brin agit comme un liant et maintient les brins ensemble, la force d'attachement entre les brins peut être un critère pour juger la cohésion. La recherche suivante rend compte de la cohésion basée sur le critère mentionné ci-dessus.

MATERIELS ET METHODES

Matériels :

Le tussah indien et importé ainsi que les fils de soie mûrier sont utilisés pour les expériences. Les caractéristiques des différentes variétés de fils sont données dans le tableau I.

Méthodes expérimentales :

Les échantillons expérimentaux sont conditionnés dans une atmosphère normale de 65 ± 2 % d'humidité relative et 27 ± 2 °C de température pendant 24 heures.

Détermination de la sérécine résiduelle :

La cohésion dans le fil de soie est principalement due à la sérécine résiduelle. Pour estimer le contenu en sérécine, les échevettes de fils de soie sont d'abord pesées (W_1), et ensuite décreusées dans une solution contenant 25 % de savon de Marseille pendant 90 minutes à ébullition conservant un rapport de solution de 50 : 1. Les échevettes de fils sont retirées, vigoureusement lavées et séchées. Les poids (W_2) des échevettes décreusées sont enregistrés à nouveau après un conditionnement de 24 heures dans une atmosphère normale. Le contenu en sérécine résiduelle est calculé comme suit :

Contenu en sérécine résiduelle (%) = $(W_1 - W_2 / W_1) \times 100$.

Détermination de la cohésion sur l'appareil de contrôle Duplan :

La cohésion (coups) des échantillons expérimentaux est déterminée sur l'appareil de contrôle de cohésion Duplan par la procédure normale (IS : 2948, 1964). Le fil de soie est maintenu par un ensemble de 10 crochets de chaque côté du cadre, sous une tension totale uniforme et constante de 180 g, de telle façon que le fil soit exposé à des coups à 20 endroits différents simultanément, à raison de 140 coups / minute. Les coups nécessaires pour produire 10 endroits ouverts d'au moins 6 mm de long sont enregistrés après avoir arrêté l'appareil plusieurs fois. Au moins 30 observations sont faites pour chaque échantillon et une longueur totale de 3,6 m est testée pour chaque observation.

Détermination de la force d'épluchage :

Puisque les baves dans un fil de soie restent collées les unes aux autres à cause de la présence de sérécine sur leurs surfaces, une estimation juste de la force de cohésion sera possible si les baves sont décollées, c'est-à-dire séparées les unes des autres. La force nécessaire pour décoller les baves peut être considérée comme une évaluation fiable de la cohésion. Pour accomplir cela, une section de fil de soie est sélectionnée au hasard et coupée à l'aide de ciseaux. Les baves sont séparées à partir d'un des bouts en deux parties égales. Ensuite, chaque partie est saisie dans les mâchoires de l'Instron Tensile Tester (4201) placé à une distance de 1 cm et déplacé de façon à décoller le fil. Les conditions du test utilisé pour cette expérience sont :

la vitesse de la tête transversale- 50 cm / min

la longueur du balayage - 5 cm

la longueur de la jauge - 1 cm

La force requise pour détacher 5 cm de fil est enregistrée. Au moins 30 observations sont considérées pour chaque variété de fil de soie.

Effet de la sérécine sur la force d'épluchage :

Pour étudier la relation entre le contenu en sérécine et la force d'épluchage, le fil tussah (type C) est sélectionné. Il contient un maximum de sérécine (7,8 %) parmi tous les fils de soie tussah.

Le fil est décreusé à ébullition avec 25 % de savon de Marseille conservant un taux de liquide de 50 pour 1. La durée du traitement varie de 5 minutes à 125 minutes pour produire des échantillons avec une quantité différente de sérécine résiduelle. Ensuite, les échantillons de fils sont testés sur l'Instron pour déterminer la force d'épluchage.

RESULTATS ET DISCUSSION

La cohésion déterminée par l'appareil de contrôle de cohésion Duplan et la force d'épluchage :

La principale source de cohésion est la présence en sérécine résiduelle. En plus de la sérécine, la cohésion dépend aussi de la nature de la sérécine, et de la surface totale disponible des baves mutuellement en contact. La surface disponible est déterminée par le nombre de baves visibles dans la coupe transversale du fil ainsi que par sa finesse et sa forme en coupes transversales. Des baves plus fines et plus nombreuses dans un fil de taille de filament donnée augmentent la surface potentielle de contact et de cohésion. Cependant, la zone réelle de contact dépendra aussi de la forme de la coupe transversale des baves. Les baves sont supposées être distribuées au hasard dans la coupe transversale du fil, on peut affirmer que plus la forme des coupes transversales s'écarte de la circularité, moins il y a de zones de contact possibles. Il en est ainsi parce qu'une fibre non circulaire en coupe transversale entrave l'emballage intime. En outre, lorsque les baves d'un fil sont décollées en deux parties égales, la séparation de baves groupées s'effectue en maintenant un contact mutuel entre les baves à l'intérieur d'un groupe intact. Par conséquent, tous les points de contact entre les baves ne sont pas susceptibles de se casser. Dans le cas présent, étant donné que le contenu en sérécine résiduelle, la finesse du brin et du fil sont différents pour les fils utilisés dans cette étude, une différence analogue dans les valeurs de cohésion et de force d'épluchage serait évidente. Ainsi une comparaison stricte entre les valeurs de force d'épluchage des fils n'est pas possible. Pour une comparaison juste, les valeurs de la force d'épluchage doivent être normalisées en trouvant la force d'épluchage par unité de surface ou la force d'épluchage par point de contact rompu.

En admettant les coupes transversales circulaires, il peut facilement être démontré que la surface d'un filament (S) est $S \propto \sqrt{\text{den}}$ où le denier est la finesse du filament. Par conséquent, la force d'épluchage par unité de surface serait proportionnelle à la force d'épluchage / le nombre de baves $\times \sqrt{\text{den}}$, ce qui est calculé à partir des valeurs connues de la force d'épluchage et de la finesse du filament.

Chaque bave consiste en deux brins. Dans la situation extrême d'une structure emballée, une structure hexagonale de baves comme postulée par Schwarz (Schwarz, 1951) pour les fibres circulaires serait attendue comme dans la figure 1 où chaque cercle représente un brin et deux cercles adjacents étroitement liés par une ligne représentent une bave. Bien que dans ce cas, la séparation de la bave est plus susceptible de se produire, alors que pour le calcul des points de contact, les contacts rompus entre les brins ont été pris en considération. Puisque la séparation peut avoir lieu le long de la ligne de manière arbitraire dans le plan de la coupe transversale du fil comme démontrée dans la figure 1, le nombre possible de points de contact cassés réels varierait et leur nombre serait comme dans le tableau II. A partir des valeurs de points de contact cassés, la force d'épluchage par point de contact cassé est aussi calculée.

Les données de cohésion obtenues sur l'appareil de contrôle de cohésion Duplan et sur l'Instron tensile tester sont présentées dans le tableau III. Cela montre que la valeur la plus élevée de cohésion se trouve dans le type E de soie mûrier suivi par le type D mûrier et le type C tussah. Aucune cohésion n'est observée pour les fils tussah de type A et de type B. La force d'épluchage, déterminée sur l'Instron montre aussi une valeur plus élevée pour la soie mûrier de type E suivie par le tussah de type

C, le type D mûrier et les types B et A tussah. Par conséquent, la force d'épluchage peut faire la distinction entre le type A et B tussah, ce que l'appareil de contrôle de cohésion Duplan n'a pas réussi à faire. Des valeurs faibles de la force d'épluchage sont observées pour les fils tussah de types A et B. Une comparaison en termes de force d'épluchage normalisée montre que la cohésion augmente dans l'ordre des types A, B et C des variétés de tussah et des types D et E de mûrier. L'ordre entre le type C et D change par rapport à l'ordre obtenu basé sur la force d'épluchage absolue et s'apparente à l'ordre obtenu par les coups de cohésion. La classification en termes de cohésion normalisée demeure ainsi identique à celle obtenue par les coups de cohésion mais devient plus sensible. Un coefficient de corrélation élevé entre la cohésion mesurée sur Duplan et la force d'épluchage normalisée en ce qui concerne la surface aussi bien que le nombre de points de contact rompus exposés dans le tableau IV justifie aussi ce fait. On peut remarquer plus loin (Tableau III) que les variétés de soies mûrier de type E contenant une sérécine résiduelle plus élevée montrent aussi une cohésion et une force d'épluchage plus élevées. Un niveau élevé du contenu en sérécine; un denier et une coupe transversale plus fins peuvent être attribués à cela. Parmi le tussah, le type C montre des valeurs de cohésion plus élevées et contient aussi une quantité maximum de sérécine. En outre, il est plus fin et contient également un nombre maximum de brins. Les coups de cohésion sont presque nuls pour un niveau de sérécine résiduelle de 5 % ou au-dessous. Néanmoins, la force d'épluchage a une valeur raisonnable, indiquant ainsi sa sensibilité au niveau de la sérécine. Il apparaît donc que la sérécine résiduelle de même que ses caractéristiques qui sont influencées par la variété tussah, affectent les valeurs de cohésion.

La sérécine résiduelle en fonction de la cohésion et de la force d'épluchage :

Pour isoler l'influence de la sérécine résiduelle seule sur la force d'épluchage, le niveau de sérécine résiduelle dans le fil tussah de type C a été modulé en décroissant pendant différentes durées. Le traçage d'une courbe entre la force d'épluchage et la sérécine résiduelle décrite dans la figure 2 met en évidence le fait que la force d'épluchage croît avec l'augmentation du contenu en sérécine résiduelle, au début lentement mais ensuite elle devient trop rapide au-delà d'un niveau de 5 % de sérécine.

CONCLUSIONS

Une corrélation étroite existe entre la force d'épluchage normalisée et les coups de cohésion déterminés sur Duplan. La force d'épluchage augmente rapidement avec la sérécine et plus particulièrement avec un contenu en sérécine résiduelle élevé. La force d'épluchage déterminée sur l'Instron est beaucoup plus sensible au changement des valeurs de cohésion, surtout lorsque le contenu en sérécine est faible.

EFFECT OF TESTOSTERONE PROPIONATE ON THE LARVAL, COCOON AND ADULT PARAMETERS OF THE BIVOLTINE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

I. I. HUGAR, R. B. NIRWANI & B. B. KALIWAL

Post-graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad-580 003,
Karnatak University, Dharwad - 580 003, Karnatak, India.

The effects of testosterone propionate on the larval, cocoon and adult parameters of bivoltine silkworm (NB18) breed, were studied. The testosterone propionate of 10.20 and 30 µg/ml concentration was topically applied independently at alternate day to silkworm of IV and V instar larvae. The treatment of all different concentrations resulted in a significant increase in larval weight, silk gland weight, cocooning percentage, silk filament weight in 10 µg treated group, denier of the silk filament, moth emergence percentage, oviposition and hatching percentage. Remaining parameters did not show any significant changes when compared with that of normal control.

Keywords: *Bombyx mori*, Testosterone propionate, larval, cocoon and adult parameters.

INTRODUCTION

Recently the metabolic significance of vertebrate type steroids in the silkworm, *Bombyx mori* L. has been reviewed (Venkataramireddy *et al.*, 1994). Vertebrate hormones and hormone like compounds have been detected in insects and in other invertebrates, (De Loof, 1987 ; Lafant, 1991). Treatment of testosterone decreased the rate of oviposition and hatchability of eggs in silkworm (Ogiso and Onishi, 1986). Topical application of testosterone propionate to silkworm (Polyvoltine) pure Mysore breed did not show any significant change in larval weight, silk gland weight and larval duration but showed an increase in fecundity and a decrease in the percentage of cocooning and moth emergence (Magadum and Magadum, 1993). But these studies were unable to explain the economic parameters like silk filament length, weight and denier, cocoon weight, shell weight and shell ratio. Hence, the present investigation was undertaken at higher doses, to know the effect of testosterone propionate on economic parameters of the bivoltine (NB18) silkworm, *B. mori*.

MATERIALS AND METHODS

The bivoltine breed of silkworm was reared in the laboratory by improved methods of rearing techniques (Krishnaswami, 1978 b, c). The larvae were maintained on fresh mulberry leaves (K₂). The IV instar larvae were divided into three experimental groups. Each subgroup consists of uniformly weighed larvae in five replications of 20 worms. The testosterone propionate (Baltimore Biological Laboratories, Division of B. D. Lab INC Maryland, U.S.A) was dissolved in small quantity of acetone and diluted to form 10.20 and 30 µg/ml by adding acetone. The topical application was made with small sterilised cotton ball on the dorsal side of the larvae. Each larva was topically applied with one of the three doses of testosterone propionate at alternate day. In each application 5 ml of solution was used to treat 100 larvae.

The acetone treated control and untreated control (normal) were also maintained. The larval, cocoon and adult parameters were recorded separately. The larval and silk gland weights were recorded before commencement of spinning. The larval duration was recorded from the day of hatching till the completion of spinning. The cocoon parameters such as female and male cocoon weight and their shell weights were recorded on the 5th day after the completion of the spinning activity. The filament length was recorded with epruvette by reeling a single cocoon. The reeled silk was dried in an hot-air oven and weight was taken in an electrical balance. The cocoon shell ratio and denier of the filament was calculated. The egg productivity was recorded in the adult after mating. The cocooning, moth emergence and hatching were also calculated by the formulas shown in the tables.

Each mean value, a record of ten worms is shown in tables I, II and III. The experiments were conducted twice to conclude the results. The data collected were subjected to analysis of variance test to find out the significance between the treated and control groups (Raghawa Rao, 1983). The percent values of cocoon shell ratio, cocooning, moth emergence and hatching percentage were transformed to sine angular values for statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The data on the effect of testosterone propionate on larval, cocoon and adult characters of the silkworm, *B. mori* are summarised in tables I, II and III.

Larval weight:

Larval body weight improved significantly by the application of all the doses of testosterone propionate. However, maximum increase of 31% was observed in 20 µg/ml treated group when compared with that of carrier control (Table I). The response to the hormone on larval weight might be due to the response of the breed. It has been reported that the larval weight did not show any response with 1.5 and 10 µg/ml treatment of testosterone propionate in case of polyvoltine breed of *B. mori* (Magadum and Magadum, 1993).

Larval duration:

The larval duration did not show any significant change in all the treated groups. It could be suggested that the concentration applied to the larvae, may not have any effect on the hormonal level, juvenile hormone and moulting hormone which control moulting and metamorphosis in insects.

Similar results have been reported in the polyvoltine breed of the silkworm, *B. mori* where larval duration did not show any significant change (Magadum and Magadum, 1993).

Silk gland weight:

The wet weight of the silk gland was significantly increased except in the group treated with 10 µg/ml when compared with that of the normal control. The significant increase in silk gland weight might be due to the response of the hormone at high concentration. On the contrary, it has been reported that the repeated application with 1.5 and 10 µg/ml testosterone propionate did not show any significant change in the silk gland weight in polyvoltine pure Mysore breed of *B. mori* (Magadum and Magadum, 1993). However, it needs further investigation.

Cocooning percentage:

The cocooning percentage was significantly increased in all the treated groups of testosterone propionate when compared with that of the normal control. This shows the larvae did not show any mortality at their larval stage and the used concentrations are safe and have not adversely affected the cocooning percentage. But it has been reported that topical application with 1.5 and 10 µg/ml concentration of testosterone propionate of single and repeated applications to silkworm larvae decreased the cocooning percentage (Magadum and Magadum, 1993).

Table I. Effect of Testosterone propionate on the larval parameters of the silkworm, *B. mori*.
 Tableau I. Effet du propionate de testostérone sur les paramètres larvaires du vers à soie, *B. mori*.

Group	Treatment Doses (µg/ml)	Larval weight (g)	Silk gland weight (g)	Larval duration (hrs)	Cocooning (%)
Groupe	Traitement Doses (µg/ml)	Poids larvaire (g)	Poids de la glande séricigène	Durée larvaire (h)	Filage du cocon (%)
I	10	2.838 * (127)	0.638 (98)	681 (98)	97.44 * 80.72 ** (109)
II	20	2.972 * (131)	0.751 * (116)	687 (99)	97.48 * 80.72 ** (109)
III	30	2.852 * (128)	0.747 * (115)	684 (99)	97.52 * 80.90 ** (109)
IV	Acetone control Témoin d'acétone	2.222 (100)	0.607 (94)	690 (100)	89.10 70.72 ** (102)
V	Normal control Témoin normal	2.225 (100)	0.645 (100)	690 (100)	89.15 70.72 ** (100)
F-test / Test F	-	S	S	NS	S
S.E.m ±	-	0.125	0.030	9.260	2.24
C.D. at / CD à 5	-	0.405	0.099	33.44	8.11

* Significant increase/decrease at 5% / Augmentation/diminution significative à 5%.

** - Angular transformed values. / Valeurs angulaires transformées.

S: Significant / Significatif; NS: Non significant / Non significatif; S.E.m: ± Standard error mean / ± Ecart type; C.D: Critical difference / Différence critique.

Percent increase/decrease over that of the carrier control in parentheses.

Pourcentage d'augmentation/de diminution par rapport au témoin acétone entre parenthèses.

$$\% \text{ cocooning} = \frac{\text{Number of cocoons formed}}{\text{Total number of larvae kept}} \times 100$$

$$\% \text{ du filage du cocon} = \frac{\text{Nombre de cocons formés}}{\text{Nombre total de larves conservées}} \times 100$$

Table II. Effect of Testosterone propionate on the cocoon parameters of the silkworm, *B. mori*.
 Tableau II. Effet du propionate de testostérone sur les paramètres du cocon du vers à soie, *B. mori*.

Group	Treatment Doses (µg/ml)	Silk filament length (m)	Silk filament weight (g)	Denier of silk filament	Female cocoon weight (g)	Female cocoon shell weight (g)	Female cocoon shell ratio (%)	Male cocoon weight (g)	Male cocoon shell weight (g)	Male cocoon shell ratio (%)
Groupe	Traitement Doses (µg/ml)	Longueur du filament de soie (m)	Poids du filament de soie (g)	Denier du filament de soie	Poids du cocon du cocon femelle (g)	Poids de l'enveloppe du cocon femelle (g)	Richesse soyeuse du cocon femelle (%)	Poids du cocon mâle (g)	Poids de l'enveloppe du cocon mâle (g)	Richesse soyeuse du cocon mâle (%)
I	10	664.2 (93)	0.230 *	3.126 *	1.518 (104)	0.221 (90)	14.56 22.38 ** (86)	1.380 (109)	0.203 (104)	14.71 22.55 ** (95)
II	20	716.2 (100)	0.182 (113)	2.222 (121)	1.466 (100)	0.237 (97)	16.17 23.66 ** (96)	1.364 (108)	0.207 (106)	15.17 22.87** (98)
III	30	571.0 (80)	0.167 (104)	2.622 *	1.574 (108)	0.227 (93)	14.42 22.30 ** (85)	1.221 (97)	0.185 (95)	15.15 22.87 ** (98)
IV	Acetone control Témoin acétone	621.2 (87)	0.158 (98)	2.296 (125)	1.449 (99)	0.240 (98)	16.56 23.97 ** (98)	1.186 (94)	0.195 (100)	16.44 23.89 ** (98)
V	Normal control Témoin normal	709.7 (100)	0.160 (100)	1.827 (100)	1.452 (100)	0.244 (100)	16.80 24.20 ** (101)	1.256 (100)	0.194 (100)	15.44 23.11** (93)
F-test	-	NS	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
S.E.m ±	-	28.92	0.0037	0.151	0.0613	0.0143	0.714	0.047	0.0095	0.693
C.D. at 5%	-	104.45	0.013	0.545	0.198	0.0464	2.317	0.154	0.0309	2.252

* - Significant increase/decrease at 5% / Augmentation/diminution significative à 5% ; ** - Angular transformed values. / Valeurs angulaires transformées ;
 S - Significatif/Significatif ; NS - Non significant / Non significatif ; S.E.m ± Standard error mean / Ecart type ; C.D. - Critical difference / Différence critique
 Percent increase/decrease over that of the carrier control in parentheses. / Pourcentage d'augmentation/de diminution par rapport au témoin acétone entre parenthèses.

$$\text{Female/male cocoon shell ratio} = \frac{\text{Cocoon shell weight}}{\text{Cocoon weight}} \times 100 \quad \text{Richesse soyeuse mâle / femelle} = \frac{\text{Poids de l'enveloppe du cocon}}{\text{Poids du cocon}} \times 100$$

$$\text{Denier} = \frac{\text{Single cocoon filament weight (gm)}}{\text{Single cocoon filament length (mt)}} \times 9000 \quad \text{Denier} = \frac{\text{Poids du filament de cocon individuel (gm)}}{\text{Longueur du filament (m)}} \times 9000$$

Cocoon weight, shell weight and shell ratio:

There was no significant change in the cocoon weight, shell weight and shell ratio in all treated groups when compared with that of the normal control.

Silk filament length, silk filament weight and denier:

The length of the silk filament decreased significantly whereas silk filament weight and denier increased in all the treated groups. A maximum increase was observed in 10 µg treated group when compared with that of normal control.

Moth emergence percentage:

There was a significant increase in moth emergence in all the treated groups when compared with that of normal control. The increase in moth emergence may be attributed to non increased mortality in pupal/moth stage. However, there was a significant decrease in the moth emergence percentage in 1.5 and 10 µg estradiol-17 β and 1 and 5 µg testosterone propionate treated groups at different hours in different instar larvae of pure Mysore breed of silkworm, *B. mori* (Magadam and Magadam, 1992 & 1993) and needs further investigation.

Egg productivity:

There was a significant increase in the egg productivity in 20 and 30 µg treated groups. But application of 10 µg/ml did not affect the egg productivity when compared with that of the normal control. Similar results have been reported in pure Mysore breed of silkworm, *B. mori* treated with 1, 5 and 10 µg/ml testosterone propionate might be due to growth stimulatory effect (Magadam and Magadam, 1993). Therefore, in the present investigation the increase in the egg productivity may be due to the growth stimulatory effect of testosterone propionate.

Hatching percentage:

There was a significant increase in hatching percentage in all the testosterone propionate treated groups. This might be due to the response of the hormone on the hatchability.

Several families of peptide hormones have members in both vertebrates and insects (Thorpe and Duve, 1988; Verhaert and Deloof, 1986). The moulting hormone of insects, ecdysone possess a steroid nucleus and is synthesised from cholesterol, similar to that of the steroid hormones in vertebrates (Karlson, 1983). A sex steroid hormones such as progesterone, testosterone and estradiol-17 β are present in insect tissue extracts (De Loof and De Clerk, 1986; Denlinger *et al.*, 1987; Paesen and De Loof, 1989; Novak and Lambert, 1989; Bradbrook *et al.*, 1990).

Vertebrate steroids may evoke dose dependent effect on insect development that resembles those of juvenoids (Sita *et al.*, 1981, 1983; Lafont, 1991). Nagashima *et al.*, (1983) reported the presence of testosterone like immunoreactive substance in their developmental stages through RIA, and the testosterone like immunoreactive substance is more in male than female. It has been reported that the steroids are simply derived from the dietary source of insects. Since vertebrate sterols appear to be present in plants (Geuns, 1978; Heftmann, 1974). The presence of these hormones in the insect body did not explain their role in insect metabolism. Ogiso and Ohnishi (1986) have reported that the topical application of estradiol to silkworm pupae/moth decreased the oviposition of eggs. Magadam and Magadam (1992 and 1993) have reported that the topical application of estradiol - 17 β improve the fecundity and decrease the larval duration, cocooning and moth emergence percentage in pure Mysore breed of silkworm, *B. mori*. They also reported that the treatment of testosterone propionate (1 and 5 µg) increase the fecundity and decrease the cocooning percentage and moth emergence. In our study it is interesting to note that the topical application with 10.20 and 30 µg/ml testosterone propionate increase in larval weight, denier of the silk filament, moth emergence percentage, oviposition and hatchability but larval duration did not show any significant change.

Table III: Effect of Testosterone propionate on the adult parameters of the silkworm, *B. mori*.Tableau III : Effet du propionate de testostérone sur les paramètres adultes du vers à soie, *B. mori*.

Group	Treatment Doses (µg/ml)	Moth emergence (%)	Egg productivity (No.s)	Hatching %
Groupe	Traitement Doses	Emergence des papillons	Productivité en oeufs	Eclosion (%)
I	10	93.54 *	392.20	93.8 *
		74.71 **		75.58 **
		(124)	(108)	(105)
II	20	96.11 *	459.20 *	94.38 *
		74.46 **		76.25 **
		(128)	(126)	(106)
III	30	97.67 *	517.00 *	94.2 *
		83.92 **		76.09 **
			(142)	(106)
IV	Acetone control <i>Témoin acétone</i>	85.71	364.40	90.37
		69.71 **		71.94 **
		(114)	(100)	(101)
V	Normal control <i>Témoin normal</i>	74.99	363.00	88.74
		60.14 **		70
		(100)	(100)	(100)
F-test / Test F	-	S	S	S
S.E.m ±	-	3.079	17.28	0.837
C.D. at 5% / CD à 5 %	-	11.119	59.94	2.954

* - Significant increase/decrease at 5% / Augmentation/diminution significative à 5%

** - Angular transformed values. / Valeurs angulaires transformées

S - Significant / Significatif; NS - Non significant / Non significatif S.E.m ± Standard error mean/ Ecart type;

C.D. - Critical difference / Différence critique.

Percent increase/decrease over that of the carrier control in parentheses.

Pourcentage d'augmentation /de diminution par rapport au témoin acétone entre parenthèses.

Moth emergence percentage =	$\frac{\text{Number of moth emerged}}{\text{Number of cocoons kept}} \times 100$
Pourcentage d'émergence des papillons =	$\frac{\text{Nombre de papillons émergés}}{\text{Nombre de cocons conservés}} \times 100$
Hatching percentage =	$\frac{\text{Total number of eggs hatched}}{\text{Total number of eggs laid}} \times 100$
Pourcentage d'éclosion =	$\frac{\text{Nombre total d'oeufs éclos}}{\text{Nombre total d'oeufs pondus}} \times 100$

Further experiments are essential to know the possible role of high concentrations of testosterone propionate in physiological activities of the silkworm, *B. mori*. The practical utility of this investigation needs further investigation to modify and confirm these results using different concentrations, duration and breeds of silkworms.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their sincere thanks to Karnatak University, Dharwad for providing financial assistance and Prof. V. L. Kallapur, Chairman, and Prof. M. A. Hooli, Post-Graduate Department of Studies in Zoology Karnatak University, Dharwad for providing necessary facilities and valuable suggestions.

REFERENCES

- BRADBROOK D. A., CLMENT C. Y., COOK B., DINAN L. (1990) The occurrence of vertebrate type steroids in insects and comparison with ecdysteroid levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95(1), 365-374.
- DE LOOF A., DE CLERK D., (1986) Vertebrate type steroids in arthropods: identification, concentrations and possible functions. In: *Advances in invertebrate reproduction* (Eds) Porchet, M.; Andries J. C. and Dhainaut A., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam pp. 117-123.
- DENLINGER D. L., BRUEGGEMEIER R. W., MECHOULAM, KATLIC N., YOCUM L. B., YOCUM G. D. (1987) Estrogens and androgens in insects. In: *Molecular Entomology* (Eds) Law J. H. and Liss A. R. pp. 189-199.
- GENUS J. M.C. (1978) Steroid hormones and plant growth and development. *Phytochemistry*, 17(1), 1-14.
- HEFTMANN E. (1974) Progress in the biochemistry of plants steroids other than sterols (Saponins glyco-alkaloids, pregnene derivatives, cardiac glycosides and sex hormones) *Lipids* 9(2), 626-639.
- KRISHNASWAMY S. (1978) New technology of silkworm rearing. Bul. No. 2, Central Sericulture Research and Training Institute, Mysore, 1-24.
- KARLSON, D. (1983) Why are so many hormone steroids? *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. Phys.* 364, 1067-1068.
- LAFONT R. (1991) Mini review reverse endocrinology or 'hormones' seeking functions. *Insect Biochem*, 21: 697-721.
- MAGADUM V. B., MAGADUM S. B. (1992) Effect of 17 β Estradiol on the economic parameters of silkworm, *Bombyx mori* L., *Entomologia Hellenica* 10 (1992) 37-40.
- MAGADUM V. B., MAGADUM S. B. (1993) Effect of testosterone propionate on the economic traits of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Korean J. Seric Sci.* 35(1), 69-72.
- NOVAK F.J.S., J. G.D.LAMBERT (1989) Prenenolone, testosterone and estradiol in migratory locust, *Locusta migratoria*, a gas chromatographical mass spectrometrical study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64, 73-82.
- NAGASHIMA E., NAKAGAKI M., SATO M., WAKABAYASHI H., BANNO Y., XIANG Z. (1983) Testosterone like immuno reactivities in the haemolymph of silkworm, *Bombyx mori* L. *Serie. Sci. Jpn* 52, 243-244.
- NIRWANI R. B. (1995) Studies on the effect of minerals, vitamins, solvents and vertebrate hormones on the economic parameters and reproduction of the silkworm, *Bombyx mori*. Thesis, Karnatak University, Dharwad, India.
- OGISO M., OHNISHI E. (1986) Does estradiol play role in ovarian maturation or embryonic development of silkworm, *Gen. Comp. Endocrinol* 61, 82-86.
- RAGHAVA RAO D. (1983) *Statistical techniques in agricultural and biological research* Oxford and IBH publishing Co. New Delhi. Venkataramireddy (1992) personnel communication.

- PAESEN G., DE LOOF A. (1989) The presence of progesterone binding protein in spermathecae of the migratory locust *Locusta migratoria migratorioides* Invert. Reprod. Devl. 14(2) 267-277.
- SITA V., A. KUMARI, D. RAGHUNATA RAO 1983. Insect growth regulating activity of a steroid nondralone decanate on *Dysdercus similis* (F) (*Heteroptera: Pyrrhocoridae*) Proc. Ind. Acad. Parasitol 4, 1-15.
- THORPE A., DUVE H. (1988) Insulin found at last? Nature, 331, 483-484.
- VERHAERT P., DE LOOF A. (1986) Substances resembling peptides of the vertebrate gonadotropin system occur in the central nervous system of *periplaneta americana* immunocytological and some biological evidences. Insect Biochem; 16(1) 195-197.
- K. VENKATARAMI REDDY, S. B. MAGADUM, V. MEERA, R. K. DATTA, Metabolic significance of vertebrate type steroids in silkworm *Bombyx mori* L. A Review, Indian J. Seric 1994. Vol. 33 No. 1 , 6-11.

EFFET DU PROPIONATE DE TESTOSTERONE SUR LES PARAMETRES LARVAIRES, DU COCON ET DES ADULTES CHEZ LE VER A SOIE BIVOLTIN, *BOMBYX MORI* L.

I. I. HUGAR, R. B. NIRWANI & B. B. KALIWAL

Post-graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad-580 003,
Karnatak University, Dharwad - 580 003, Karnatak, Inde.

Nous avons étudié les effets du propionate de testostérone sur les paramètres larvaires, du cocon et des adultes de la race de vers à soie bivoltin (NB₁₈). Le propionate de testostérone à des concentrations de 10, 20 et 30 µg / ml a été appliqué de manière topique tous les deux jours sur des vers à soie des stades larvaires IV et V. Le traitement aux différentes concentrations entraîne une augmentation significative du poids larvaire, du poids de la glande séricigène, du pourcentage de coconage, du poids du filament de soie dans le groupe traité à 10 µg, du titre du filament, du pourcentage d'émergence des papillons, du pourcentage d'éclosion et d'oviposition. Les autres paramètres ne présentent pas de changements significatifs par rapport au témoin normal.

INTRODUCTION

Récemment, une revue sur la signification métabolique des stéroïdes de type vertébré chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. a été publiée (Venkataramireddy et coll., 1994). Des hormones de vertébrés et des composés semblables aux hormones ont été détectés chez des insectes et chez d'autres invertébrés, (De Loof, 1987 ; Lafant, 1991). Le traitement à la testostérone fait baisser le taux d'oviposition et d'éclosion des oeufs chez le ver à soie (Ogiso et Onishi, 1986). L'application topique de propionate de testostérone chez le ver à soie (Polyvoltin) de la race Pure Mysore n'entraîne pas de changement significatif du poids larvaire, du poids de la glande séricigène et de la durée larvaire mais elle induit un accroissement de la fécondité et une baisse du pourcentage de coconage et d'émergence des papillons (Magadum et Magadum, 1993). Cependant, ces études ne tiennent pas compte des paramètres économiques comme la longueur du filament soyeux, le poids et le titre, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse. Par conséquent, cette recherche a été entreprise à doses plus élevées pour connaître l'effet du propionate de testostérone sur les paramètres économiques du ver à soie bivoltin (NB₁₈), *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

La race bivoltine de vers à soie a été élevée dans le laboratoire par des méthodes améliorées de techniques d'élevage (Krishnaswami, 1978 b, c). Les larves sont maintenues sur des feuilles de mûriers fraîches (K₂). Les larves du stade IV sont divisées en trois groupes expérimentaux. Chaque sous groupe consiste en des larves de poids uniforme en cinq répétitions de 20 vers. Le propionate de testostérone (Baltimore Biological Laboratories, Division of B.D. Lab INC Maryland, U.S.A.) est dissout dans une faible quantité d'acétone et dilué afin d'obtenir des concentrations de 10, 20 et 30 µg/ml en ajoutant de l'acétone. L'application topique a été faite avec une petite boule de coton stérilisé sur la face dorsale des larves. Chaque larve a été traitée individuellement avec une des trois doses de propionate de testostérone un jour sur deux. Pour chaque application, 5 ml de solution sont utilisés

pour traiter 100 larves. Le témoin traité à l'acétone et le témoin non traité (normal) sont aussi maintenus. Les paramètres larvaires, du cocon et des adultes ont été enregistrés séparément. Les poids larvaires et de la glande séricigène ont été mesurés avant le début du filage. La durée larvaire correspond à la période entre le jour de l'éclosion et l'achèvement du filage. Les paramètres du cocon tels que le poids du cocon mâle et femelle et le poids de leur coque ont été mesurés le cinquième jour après l'achèvement de l'activité de filage. La longueur du filament a été mesurée avec une éprouvette en dévidant les cocons un à un. La soie dévidée a été séchée dans un four à air chaud et pesée sur une balance électrique. La richesse soyeuse du cocon et le titre du filament sont calculés. La productivité en oeufs est enregistrée chez l'adulte après l'accouplement. Le coconage, le taux d'émergence du papillon et l'éclosion sont également calculés par les formules indiquées dans les tableaux.

Chaque valeur moyenne représentant la mesure sur dix vers est indiquée dans les tableaux I, II et III. Les expériences ont été menées deux fois pour conclure. Les données recueillies ont été soumises à l'analyse de variance pour estimer les différences significatives entre les groupes traités et les groupes témoins (Raghawa Rao, 1983). Les valeurs de richesse soyeuse, de pourcentage de coconage, d'émergence du papillon et d'éclosion ont été transformées en valeurs angulaires pour les analyses statistiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur l'effet du propionate de testostérone sur les caractères larvaires, du cocon et des adultes du ver à soie, *B. mori* sont résumées dans les tableaux I, II et III.

Le poids larvaire :

Le poids du corps larvaire augmente de façon significative pour toutes les doses de propionate de testostérone. Néanmoins, un accroissement maximal de 31 % par rapport au témoin acétone est observé dans le groupe traité avec 20 µg/ml (Tableau I). La réaction aux hormones sur le poids larvaire pourrait dépendre de la race. On sait que le poids larvaire n'est pas modifié par un traitement avec 1,5 et 10 µg / ml de propionate de testostérone dans le cas d'une race polyvoltine de *B. mori* (Magadum et Maganum, 1993).

La durée larvaire :

La durée larvaire ne montre aucun changement significatif dans l'ensemble des groupes traités. On peut suggérer que la concentration appliquée aux larves n'a aucun effet sur le niveau hormonal, l'hormone juvénile et l'hormone de mue qui contrôlent la mue et la métamorphose chez les insectes.

Des résultats similaires ont été observés chez la race polyvoltine du ver à soie, *B. mori* où la durée larvaire ne présente aucun changement significatif (Magadum et Magadum, 1993).

Le poids de la glande séricigène :

Le poids frais de la glande séricigène est augmenté de façon significative à l'exception du groupe traité avec 10 µg / ml par comparaison avec celui du témoin normal. L'accroissement significatif du poids de la glande séricigène pourrait être dû à la réaction de la concentration élevée d'hormones. Au contraire, on sait que l'application répétée avec 1,5 et 10 µg / ml de propionate de testostérone n'entraîne aucun changement significatif du poids de la glande séricigène chez la race pure Mysore du *B. mori* (Magadum et Magadum, 1993). Mais cela nécessite plus de recherches.

Le pourcentage de coconage :

Le pourcentage de coconage est significativement accru dans l'ensemble des groupes traités avec le propionate de testostérone par rapport à celui du témoin normal. Cela montre que les larves ne présentent aucune mortalité au stade larvaire et que les concentrations utilisées sont sûres et n'ont pas touché défavorablement le pourcentage de coconage. Mais il a été rapporté que l'application topique avec une concentration de 1,5 µg / ml de propionate de testostérone pour des applications uniques ou

répétées chez les larves de vers à soie décroît le pourcentage de coconage (Magadum et Magadum, 1993).

Le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse :

Il n'y a pas de changement significatif dans le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse dans l'ensemble des groupes traités par comparaison au témoin normal.

La longueur du filament de soie, le poids du filament et le titre :

La longueur du filament décroît de façon significative alors que le poids du filament et le titre augmentent dans tous les groupes traités. Une augmentation maximale est observée chez le groupe traité à 10 µg.

Le pourcentage d'émergence des papillons :

Il n'y a pas d'augmentation significative du pourcentage d'émergence dans l'ensemble des groupes traités par rapport à celui du témoin normal. L'augmentation du pourcentage d'émergence des papillons peut être attribuée à la mortalité stable au stade pupal / papillon. Néanmoins, il y a une baisse significative dans le pourcentage d'émergence pour des traitements à l'oestradiol (1,5 et 10 µg) et au propionate de testostérone (1 et 5 µg) à différentes heures et à différents âges chez la race pure Mysore de vers à soie, *B. mori* (Magadum et Magadum, 1992 & 1993). Mais cela nécessite d'autres recherches.

La productivité en oeufs :

Il y a une augmentation significative de la production d'oeufs chez les groupes traités à 20 et 30 µg. Mais l'application de 10 µg / ml n'affecte pas la productivité en oeufs par comparaison avec celle du témoin normal. Des résultats analogues ont été signalés chez la race pure Mysore de *B. mori* traitée avec 1,5 et 10 µg / ml de propionate de testostérone. Ces résultats pourraient être dus à l'effet de stimulation de la croissance (Magadum et Magadum, 1993). Par conséquent, dans la présente étude, l'augmentation de la productivité en oeufs peut être attribuée à l'effet de stimulation de la croissance.

Le pourcentage d'éclosion :

Il y a une augmentation significative du pourcentage d'éclosion dans l'ensemble des groupes traités au propionate de testostérone. Cela peut être dû à la réaction des hormones sur l'éclosabilité.

Chez les vertébrés et les insectes, plusieurs familles d'hormones peptidiques sont présentes (Thorpe et Duve, 1988 ; Verhaert et Deloof, 1986). L'hormone de mue des insectes, l'ecdysone, possède un noyau stéroïde et est synthétisée à partir du cholestérol, pareillement aux hormones stéroïdes chez les vertébrés (Karlson, 1983). Des hormones stéroïdes sexuelles telles que la progestérone, la testostérone et la 17-β-oestradiol sont présentes dans les extraits de tissus d'insectes (De Loof et De Clerk, 1986 ; Denlinger et coll., 1987 ; Paesen et De Loof, 1989 ; Novak et Lambert, 1989 ; Bradbrook et coll., 1990).

Les stéroïdes de vertébrés peuvent provoquer un effet de dose dépendant sur le développement des insectes qui ressemble à celui des juvénoides (Sita et coll., 1981, 1983 ; Lafont, 1991). Nagashima et coll., (1983) signalent la présence de substances ressemblant à la testostérone réagissant en RIA, et la substance immunoréactive est en quantités supérieures chez le mâle par rapport à la femelle. On sait que les stéroïdes proviennent du régime alimentaire des insectes, étant donné que des stérols de vertébrés semblent être présents dans les plantes (Geuns, 1978 ; Hefmann, 1974). La présence de ces hormones dans le corps des insectes n'explique pas leur rôle dans le métabolisme des insectes. Ogiso et Ohnishi (1986) ont remarqué que l'application topique d'oestradiol sur la chrysalide et le papillon du ver à soie diminue l'oviposition. Magadum et Magadum (1992 et 1993) ont signalé que l'application topique de 17-β-oestradiol améliore la fécondité et diminue la durée larvaire, le pourcentage de coconage et d'émergence du papillon chez la race pure Mysore du ver à soie *B. mori*. Ils affirment aussi que le traitement au propionate de testostérone (1 et 5 µg) augmente la fécondité

et diminue le pourcentage de filage du cocon et d'émergence des papillons. Dans notre étude, il est intéressant de remarquer que l'application topique de 10,20 et 30 μg / ml de propionate de testostérone accroît le poids larvaire, le titre du filament de soie, le pourcentage d'émergence du papillon, l'oviposition et l'éclosabilité, mais la durée larvaire ne change pas significativement.

De nouvelles expériences sont primordiales pour connaître le rôle éventuel des concentrations élevées de propionate de testostérone dans les activités physiologiques du ver à soie, *B. mori*. L'utilité pratique de cette recherche nécessite de nouvelles études qui font appel à différentes concentrations, durées et races de vers à soie pour infirmer et confirmer ces résultats.

IMPROVED GROWTH OF SILKWORMS FROM EFFECTIVE TREATMENT OF MULBERRY DISEASES BY *ACACIA* *AURICULIFORMIS* EXTRACT

SUBHAS CHANDRA DATTA, SANTI PRASAD SINHABABU & NIRMAL CHANDRA
SUKUL*

Department of Zoology, Visva-Bharati University, Santiniketan - 731 235, West Bengal, India.

*The ethanolic extract of the funicles of **Acacia auriculiformis** A. Cunn. is highly effective at a dose of 160 mg/plant in ameliorating the root-knot disease of mulberry caused by *Meloidogyne incognita* and foliar diseases caused by *Phyllactina corylea*, *Maconellicoccus hirsutus* and mosaic virus. The plant extract which is soluble in water and applied by foliar spray and soil drench has increased the protein content of mulberry leaves. No toxic residues in leaves were traced by TLC 15 days after treatment. Silkworm larvae feeding on the leaves of treated plants showed improved growth, increased cocoon and shell weight, fewer feeding to cocoon formation and zero mortality rate.*

Keywords: *Acacia auriculiformis*, mulberry, root-knot disease, powdery mildew, tukra, mosaic virus, control, silkworm growth.

INTRODUCTION

The root-knot disease of mulberry caused by the nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, Chitwood 1949) is very widespread affecting more than 80% plantations in different parts of India (Teotia and Sen, 1994). The disease reduces plant growth, leaf yield and leaf-protein content significantly (Saha *et al.*, 1983, Govindaiah and Sharma, 1994; Paul *et al.*, 1995a). Among the common foliar diseases are powdery mildew caused by the fungus *Phyllactina corylea* (Pers) Karst, tukra caused by the mealy bug *Maconellicoccus hirsutus* (Green) and the viral disease caused by the mosaic virus (Teotia and Sen, 1994). These foliar diseases also reduce leaf yield and the nutritive value of leaves (Chanturiya, 1968; Teotia and Sen, 1994).

The use of chemical pesticides may achieve a measure of control of those mulberry diseases but there remains the problem of residual toxicity in the treated plants. This toxicity results in reduced palatability of the leaves to the feeding silkworm larvae, reduction in growth of the larvae and also in silk production as with the nematicide Furadan (Paul *et al.*, 1995b). Many plant substances provide effective nematicides which are easily biodegradable (Sukul 1992, 1994). We have already observed that the extract from the funicles of *Acacia auriculiformis* is effective in reducing root-knot disease of mulberry leaving no residual toxicity in leaves to affect the growing silkworm larvae (Paul *et al.*, 1995b). The purpose of the present investigation is to further confirm the efficacy of the *Acacia* extract in ameliorating the root-knot diseases and also to find out if the extract can reduce the three foliar diseases under field conditions. The effect of the leaves of *Acacia*-treated plants on the leaf consumption and growth of silkworm larvae was also observed.

* To whom correspondence should be addressed

MATERIALS AND METHODS

Site of experimental plots:

The field experiment was carried out at the Sriniketan Sericultural Composite Unit, Government of West Bengal. A total area of 0.02 ha was divided into 8 plots, each measuring 0.022 ha. The field was grown with naturally infected mulberry plants, 50-60 cm in height. There were 20 plants per plot. At first all the plants were pruned, manured with NPK and irrigated every 7 days. Rhizospheric soil was interchanged among the plants to keep the nematode infection as uniform as possible. The plants were allowed to grow for a period of 84 (two months and 24 days) days when their disease were assessed.

Root-knot disease:

Soil and root samples were taken at random from all the 8 plots. *Meloidogyne incognita* populations were estimated in the rhizospheric soil (Christie and Perry, 1951) as well as roots of mulberry plants (Das and Sukul, 1986). Number of leaves and of root galls per plant was counted. The total protein content of the leaf and root samples from each of the 8 plots was determined (Lowry *et al.*, 1951, Chatterjee and Sukul, 1981).

Foliar diseases :

The main foliar diseases observed in these plots and identified according to their characteristic symptoms were powdery mildew, tukra and mosaic virus. Diseased leaves of each type were counted in each plot.

Treatment:

Air-dried and powdered funicles of *A. auriculiformis* were extracted with 90% ethanol at room temperature. The residue, obtained after removal of the solvent under reduced pressure, was dried over anhydrous calcium chloride. The residue was dissolved in distilled water at 2 mg / ml and applied to 6 plots twice at an interval of 15 days. Each plant was treated both by foliar spray as well as by soil drench using 20 ml solution for each type of treatment. The remaining plots served as untreated controls. Fifteen days after the second treatment all the above diseases were assessed again.

Analysis of residue:

Mulberry leaves, collected 15 days after the 2nd treatment, were homogenised in a blender and extracted with ethanol. The residue was run in a TLC plate with the standard from the test substance.

Effect of treatment on feeding silkworms:

Eggs of a mother moth of multivoltine Nistari race were divided into two groups. The larvae of one group were fed with the leaves of infected but untreated plants and those of the second group with the leaves of treated plants. Leaves were used for feeding 15 days after the 2nd treatment. The larvae were kept inside a rearing chamber at $27 \pm 2^\circ \text{C}$ and $70 \pm 15\%$ RH. The weight of the larvae and that of the leaves served were recorded daily until the larvae started spinning. The silk layer ratios (shell weight/cocoon weight $\times 100$) were determined.

RESULTS

Root-knot disease:

The effect of treatment on *M. incognita* infestation of mulberry is given in Table I. Treated plants showed higher protein content in leaves and roots ($p < 0.1$, t-test). While *M. incognita* population increased significantly both in soil as well as in roots ($p < 0.1$, t-test) in 30 days in untreated plants, the population decreased significantly ($p < 0.1$, t-test) in soil and roots of treated plants during the same period. The number of root galls also decreased significantly ($p < 0.1$, t-test) after treatment (Table I).

Table I. Effect of *Acacia auriculiformis* extract on *Meloidogyne incognita* infection of mulberry plants in a field.**Tableau I. Effet de l'extrait d'*Acacia auriculiformis* sur l'infestation par *Meloidogyne incognita* de plants de mûrier en champs.**

Number of leaves per plant		Leaf protein content (%) Day 30			Root protein content (%) Day 30		Nematode Population Soil (200g)		Root (2 g)		Number of root galls / plant	
Date of treatment Day 0	After treatment Day 30	Apical	Middle	Base			Day 0	Day 30	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
Nombre de feuilles par plant		Contenu en protéines des feuilles Jour 30			Contenu en protéines de la racine (%) Jour 30		Population de Nématodes Sol (200 g)		Racine (2 g.)		Nombre de galles de la racine / plant	
Jour du traitement Jour 0	Après le traitement Jour 30	Apical	Milieu	Base			Jour 0	Jour 30	Jour 0	Jour 30	Jour 0	Jour 30
Untreated plots / Lots non traités												
380ax	305ax	2.32 ax	2.54 ax	3.16 ax	4.40a		2350 ax	2477ay	989 ax	4181 ay	1260 ax	1052 ax
Treated plots / Lots traités												
420 bx	433 bx	7.00 bx	8.80 bx	6.77 bx	7.80b		1550 bx	65by	1568 bx	108 by	1398bx	206 by

a, b - Significant difference by 't' test ($P < 0.01$) in the same column.a, b - Différence significative avec le test « t » ($P < 0.01$) dans la même colonne.x, y - Significant difference by 't' test ($P < 0.01$) in the same row between day 0 and day 30 of each character.x, y - Différence significative par le test 't' ($P < 0.01$) dans la même ligne entre le jour 0 et le jour 30 de chaque caractère.

Foliar diseases:

Acacia extract significantly reduced ($p < 0.01$, t-test) the number of leaves infected with tukra disease, powdery mildew and mosaic virus as compared to the pre-treatment condition (Table II). The percentages of control achieved were 82.08 for tukra, 95.37 for powdery mildew and 78.56 for virus infection as compared to the pre-treatment level. In case of the untreated plots tukra and fungal diseases showed 31.48 and 27.71% reduction respectively, in 30 days.

Table II. Effect of *Acacia auriculiformis* extract on Tukra disease (caused by *Maconellicoccus hirsutus* Green), fungal disease, powdery mildew (caused by *Phyllactinia corylea* Pers) and viral disease (caused by mosaic virus) of mulberry plants in a field assessed initially (day 0) and after a period of 30 days (day 30).

Tableau II. Effets de l'extrait d'*Acacia auriculiformis* sur les maladies du Tukra (provoquée par *Maconellicoccus hirsutus* Green), la maladie fongique, du mildiou poudreux provoqué par *Phyllactinia corylea* Pers) et du virus de la mosaïque sur des plants de mûrier en champs évalués au début (jour 0) et au bout de 30 jours (jour 30).

Average infected leaves / plant (%)					
Tukra disease		Fungal disease		Viral disease	
Day 0	Day 30	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
Moyenne de feuilles infestées / plant (%)					
Maladie Tukra		Maladie fongique		Maladie virale	
Jour 0	Jour 30	Jour 0	Jour 30	Jour 0	Jour 30
Untreated plots					
<i>Lots non traités</i>					
62.00 ax	43.10 ay (30.48)	83.70 ax	60.50 ay (27.71)	70.60 ax	65.30 ax (7.51)
Treated plots					
<i>Lots traités</i>					
70.14 ax	12.57 by (82.08)	90.00 ax	4.17 by (95.37)	81.50 ax	17.47 by (78.56)

x, y - Significant difference ($P < 0.05$ t-test) in a row between day 0 and day 30 for each disease.

x, y - Différence significative ($P < 0.05$, test-t) dans une rangée entre jour 0 et jour 30 pour chaque maladie.

a, b - Significant difference ($P < 0.01$) by 't' test in a column. Figures in parentheses show percentages of reduction on day 30 as compared to the initial level on day 0 in the same row.

a, b - Différence significative ($P < 0.001$) par le test « t » dans une colonne. Les chiffres entre parenthèses montrent un pourcentage de réduction au jour 30 par rapport au niveau initial au jour 0 dans la même rangée.

Analysis of residues:

Mulberry leaves, collected 15 days after treatment, did not contain any residue of the test substance.

Effect on feeding silkworms:

All data on silkworms maintained on the leaves of *Acacia*-treated and untreated plants are presented in Table III.

Table III. Effect of *Meloidogyne incognita* infected and *Acacia* extract treated mulberry plants in a field on the feeding and growth of silk worms.

Tableau III. Effets du traitement avec de l'extrait d'Acacia de plants de mûrier infestés par Meloidogyne incognita sur l'alimentation et la croissance des vers à soie

Average consumption of leaves (g)			Average larval weight			Average weight		Average Shell ratio (SR %)	No. of Feeding to cocoon (SR%)	Mortality Rate (%)
3rd instar	4th instar	5th instar	3rd instar	4th instar	5th instar	Cocoon	Shell			
<i>Consommation moyenne en feuilles (g)</i>			<i>Poids larvaire moyen (g)</i>			<i>Poids moyen (g)</i>		<i>Richesse soyeuse moyenne</i>	<i>No. de repas jusqu' aux cacons</i>	<i>Taux de mortalité (%)</i>
3ème âge	4ème âge	5ème âge	3ème âge	4ème âge	5ème âge	Cocon	Enveloppe	(RS %)		
0.06a	0.33a	3.58a	0.02a	0.31a	1.55a	0.84a	0.14a	17.03a	71.00a	26.09
Infected and acacia treated plants / Plants infestés et traités à l'acacia										
0.05a	0.28b	2.34b	0.02a	0.37b	2.54b	1.41b	0.20b	18.30b	61.00b	0.00

a,b - Different small letters in a column show significant difference ($P < 0.05$) by 't' test.

a, b - Des lettres minuscules différentes dans une colonne indiquent une différence significative ($P < 0.05$) d'après le test 't'.

The average consumption of leaves by the 4th and 5th instars was less for treated plants than for untreated ones ($p < 0.05$, t-test). However, the average weight of both the 4th and 5th instars and also of the cocoon and shell was higher with treated plants than with untreated ones ($p < 0.05$, t-test). The shell ratio was higher with treated plants than with untreated ones ($p < 0.05$). The mortality rate was nil with treated plants and 26.09% with untreated ones (Table III).

DISCUSSION

Acacia extract not only reduced both root-knot and foliar disease significantly but also improved the nutritive value of the leaves. This higher nutritive value of treated plants contributed to higher growth of larvae and silk production. The improved health of the larvae from the treated group might have resulted in the total elimination of the mortality rate. Or, the *Acacia* extract might have infused into mulberry leaves a substance that has conferred disease resistance on growing larvae. We have already reported that the active principles in the funicles of *A. auriculiformis* are two triterpenoid saponins, Acaciaside A and Acaciaside B (Ghosh *et al.*, 1993). However, there is no need to purify the active compounds and the crude residue from the ethanolic extract is effective at 160 mg/plant (1.6 kg/ha).

ACKNOWLEDGEMENTS

The work described here has been supported by a grant from the Central Silk Board, Government of India under the National Sericulture Project. We are thankful to the Joint Director of the Sriniketan Sericultural Composite Unit, Sriniketan, Government of West Bengal for providing necessary facilities for the field experiments.

REFERENCES

- CHANTURIYA N. N. (1968) Biochemical characteristics of mulberry leaves damaged by powdery mildew Soobsheh. Akad. Navk. Cruz S. S. R., 53, 799-804.
- CHATTERJEE A., SUKUL N. C. (1981) Total protein content of galled roots as an index of root-knot nematode infestation of lady's finger plants. Phytopathology, 71, 372-374.
- CHITWOOD B. G. (1949) Root-knot nematodes - Part 1. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. Proc. helm. Soc. Wash., 16, 90-104.
- CHRISTIE J. R., PERRY V. G. (1951) Removing nematodes from soil. Proc. helm. Soc. Wash., 18, 106-108.
- DAS S., SUKUL N. C. (1986) Biochemical changes of some crop plants due to root-knot nematode infestation. Proc. nat. Symp. of new dimension in Parasitology, Allahabad, India, 18-19 jan, 1986, pp. 122-125.
- GOVINDAIAH, SHARMA D. D. (1994) Root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting mulberry - a review. Indian J. Seric., 33(2) 110-113.
- GHOSH M., SINHABABU S. P., SUKUL N. C. (1993) Antifilarial effect of two triterpenoid saponins. Indian J. Exp. Biol., 31, 604-606.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH J. J., FARR A. L., RANDALL R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- PAUL A., SINHABABU S. P., SUKUL N. C. (1995a) Effect of nematode infected mulberry plants on the growth and silk production of *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 34(1), 18-21.
- PAUL A., SINHABABU S. P., SUKUL N. C. (1995b) Effect of *Meloidogyne incognita* infected mulberry plants and their treatment with nematicides on feeding silkworms, *Bombyx mori* L. Sericologia, 35(3), 577-581.
- SAHA S. S., SINHABABU S. P., SUKUL N. C. (1983) The effect of nematode infestation on mulberry plants and their effect on feeding silkworm *Bombyx mori* L. Nematologica, 29, 463-467.
- SUKUL N. C. (1992) Plants antagonistic to plant parasitic nematodes. Indian Rev. Life Sci., 12, 23-52.
- SUKUL N. C. (1994) Biopesticides in nematode control in: management of Agricultural pollution in India. (eds. Dhaliwal G. S., Kansal B. D.), Commonwealth Publishers, New Delhi, pp. 248-269.
- TEOTIA R. S., SEN S. K. (1994) Mulberry diseases In India and their control. Sericologia, 34, 1-18.

AMELIORATION DE LA CROISSANCE DES VERS A SOIE PAR TRAITEMENT DES MALADIES DU MURIER AVEC UN EXTRAIT D'*ACACIA AURICULIFORMIS*

SUBHAS CHANDRA DATTA, SANTI PRASAD SINHABABU & NIRMAL CHANDRA
SUKUL*

Department of Zoology, Visva-Bharati University, Santiniketan - 731 235, West Bengal, Inde.

L'extrait d'éthanol des funicules d'Acacia auriculiformis A. Cunn. est très efficace à une dose de 160 mg par plant diminuant la maladie du nodule de la racine du mûrier provoquée par Meloidogyne incognita, et les maladies foliaires elles-mêmes occasionnées par Phyllactina corylea, Maconellicoccus hirsutus et le virus de la mosaïque. L'extrait de plants soluble dans l'eau et appliqué par pulvérisations foliaires et par arrosage du sol a augmenté le contenu en protéines des feuilles de mûrier. Aucune trace de résidu toxique dans les feuilles n'est détectée par TLC 15 jours après le traitement. Les larves de vers à soie se nourrissant sur les feuilles des plants traités montrent une croissance améliorée, une augmentation du poids de la coque et du cocon, une alimentation moindre pour la formation du cocon et un taux de mortalité égal à zéro.

INTRODUCTION

La maladie du nodule de la racine du mûrier provoquée par le nématode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, Chitwood 1949) est très répandue, affectant plus de 80 % des plantations dans différentes parties de l'Inde (Teotia et Sen, 1994). La maladie réduit de façon significative la croissance du plant, le rendement en feuilles et le contenu en protéines de la feuille (Saha et coll., 1983, Govindaiah et Sharma, 1994 ; Paul et coll., 1995a). Parmi les maladies foliaires courantes, il y a le mildiou poudreux provoqué par le champignon *Phyllactina corylea* (Pers) le tukra de Karst causé par l'aleurode *Maconellicoccus hirsutus* (Green) et la maladie virale due au virus de la mosaïque (Teotia et Sen, 1994). Ces maladies foliaires réduisent aussi le rendement en feuilles et la valeur nutritive des feuilles (Chanturiya, 1968 ; Teotia et Sen, 1994).

L'utilisation des pesticides chimiques peut parvenir à un certain contrôle de ces maladies du mûrier mais il reste le problème de la toxicité résiduelle dans les plants traités. Cette toxicité se solde par une rapidité réduite des feuilles pour l'alimentation des larves du ver à soie, la réduction de la croissance des larves et aussi pour la production de soie comme avec le nématicide Furadan (Paul et coll., 1995b). De nombreuses substances végétales fournissent d'efficaces nématicides qui sont facilement biodégradables (Sukul 1992, 1994). Nous avons déjà observé que l'extrait des funicules d'*Acacia auriculiformis* est efficace en réduisant la maladie du nœud de la racine du mûrier ne laissant aucune toxicité résiduelle dans les feuilles pour affecter la croissance des larves du ver à soie (Paul et coll., 1995b). Le but de la présente recherche est de confirmer à nouveau l'efficacité de l'extrait d'*Acacia* sur la maladie du nœud de la racine et aussi de découvrir si l'extrait peut réduire les trois

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

maladies foliaires selon les conditions du terrain. L'effet des feuilles de plants traités à l'*Acacia* sur la consommation de feuilles et la croissance des larves du ver à soie a aussi été mesuré.

MATERIELS ET METHODES

Le site des terrains expérimentaux :

L'expérience de terrain a été effectuée à Sriniketan Sericultural Composite Unit, Government of West Bengal. Un terrain de 0,02 hectares a été divisé en lots, chacun mesurant 0,022 hectares. Le terrain a été cultivé avec des plants de mûriers infectés naturellement, d'une hauteur de 50 - 60 cm. Il y a 20 plants par parcelle. En premier lieu, tous les plants sont taillés, fumés avec NPK et irrigués une fois par semaine. Ensuite, le sol rhizosphérique est échangé entre les plants pour conserver l'infection de nématodes aussi uniforme que possible. Les maladies des plants sont évaluées après 84 jours de croissance (deux mois et 24 jours).

La maladie du nocud de la racine :

Des échantillons de sol et de racines sont pris au hasard dans l'ensemble des huit parcelles. Les populations de *Meloidogyne incognita* sont évaluées dans le sol rhizosphérique (Christie et Perry, 1951) aussi bien que dans les racines des plants de mûrier (Das et Sukul, 1986). Le nombre de feuilles et de galles de racines par plant est mesuré. Le contenu total en protéines des échantillons de feuilles et de racines provenant de chacun des huit lots est déterminé (Lowry et coll., 1951, Chatterjee et Sukul, 1981).

Les maladies foliaires :

Les principales maladies foliaires observées dans ces lots et identifiées selon leurs symptômes caractéristiques sont le mildiou poudreux, le virus de la mosaïque et le tukra. Les feuilles malades de chaque type sont dénombrées dans chaque lot.

Le traitement :

Les funicules de *A. auriculiformis* réduits en poudre et séchés à l'air sont extraits avec 90 % d'éthanol à température ambiante. Le résidu, obtenu après élimination du solvant sous une pression réduite, est séché sur du chlorure de calcium anhydre. Le résidu est dissout dans de l'eau distillée à 2 mg / ml et appliqué à 6 lots deux fois à 15 jours d'intervalles. Chaque plant est traité par pulvérisations foliaires et par humidification du sol utilisant 20 ml de solution pour chaque type de traitement. Les lots restants servent de témoins non traités. Quinze jours après le second traitement, toutes les maladies mentionnées ci-dessus sont à nouveau évaluées.

L'analyse du résidu :

Les feuilles de mûrier, cueillies 15 jours après le deuxième traitement, sont homogénéisées dans un broyeur et extraites avec de l'éthanol. Le résidu est élevé sur une plaque de TLC (Chromatographie couche mince) avec des standards de la substance testée.

L'effet du traitement sur l'alimentation des vers à soie :

Les oeufs des papillons femelles de la race polyvoltine Nistari sont divisés en deux groupes. Les larves d'un groupe sont nourries avec les feuilles de plants infectés mais non traités et celles du deuxième groupe avec les feuilles de plants traités. Les feuilles sont utilisées pour l'alimentation 15 jours après le deuxième traitement. Les larves sont maintenues à l'intérieur d'une chambre d'élevage à $27 \pm 2^\circ \text{C}$ et $70 \pm 15\%$ d'humidité relative. Le poids des larves et celui des feuilles utilisées sont enregistrés quotidiennement jusqu'à ce que les larves commencent à filer. Les rapports des couches de soie (le poids de la coque / le poids du cocon $\times 100$) sont déterminés.

RESULTATS

La maladie du noeud de la racine :

L'effet du traitement sur l'infestation du mûrier par *M. incognita* est indiqué dans le tableau I. Les plants traités affichent un contenu élevé en protéines dans les feuilles et les racines ($p < 0,1$, test t). Pendant que la population de *M. incognita* augmente de façon significative dans le sol et dans les racines ($p < 0,1$, test t) durant 30 jours dans des plants non traités, la population décroît de façon significative ($p < 0,1$, test t) dans le sol et les racines de plants traités pendant la même période. Le nombre de galles de racines décroît aussi de façon significative ($p < 0,1$, test t) après le traitement (Tableau I).

Les maladies foliaires :

L'extrait d'*Acacia* réduit de façon significative ($p < 0,1$, test t) le nombre de feuilles infectées par la maladie tukra, le mildiou poudreux et le virus de la mosaïque par comparaison avec le témoin (Tableau II). Les pourcentages par rapport au témoin sont de 82,08 pour tukra, 95,37 pour le mildiou poudreux et 78,56 pour les infections virales par comparaison avec le niveau de pré-traitement. Dans le cas de lots non traités, les maladies tukra et fongiques présentent respectivement 31,48 et 27,71 % de réduction en 30 jours.

L'analyse des résidus :

Les feuilles de mûrier, ramassées 15 jours après le traitement, ne contiennent aucun résidu de la substance test.

L'effet sur l'alimentation du ver à soie :

Toutes les données sur les vers à soie maintenues sur les feuilles des plants non traités et traités à l'*Acacia* sont présentées dans le tableau III.

La consommation moyenne de feuilles avant les quatrième et cinquième âges est moindre pour les plants traités que pour les plants non traités ($p < 0,05$, test t). Cependant, le poids moyen des quatrième et cinquième âges et aussi celui du cocon et de la coque sont plus élevés avec les plants traités qu'avec les plans non traités ($p < 0,05$, test t). Le rapport de la coque est plus élevé avec les plants traités qu'avec les plants non traités ($p < 0,05$). Le taux de mortalité est nul avec les plants traités, et il est de 26,09 % avec les plants non traités (Tableau III).

DISCUSSION

L'extrait d'*Acacia* ne réduit pas seulement la maladie foliaire et du noeud de la racine de façon significative mais il améliore aussi la valeur nutritive des feuilles. Cette valeur nutritive plus élevée des plants traités contribue à la croissance plus élevée des larves et de la production de soie. La meilleure santé des larves du groupe traité pourrait conduire à l'élimination totale du taux de mortalité. Ou alors l'extrait d'*Acacia* pourrait infuser aux feuilles de mûrier une substance qui confère une résistance à la maladie sur larves en cours de croissance. Nous avons déjà rapporté que les principes actifs dans les funicules de *A. auriculiformis* sont deux saponines triterpénoides, Acasiaside A et Acasiaside B (Ghosh et coll., 1993). Néanmoins, il est inutile de purifier les composés actifs car le résidu brut de l'extrait d'éthanol est efficace à 160 mg / plant (1,6 kg /ha).

POPULATION DYNAMICS OF *AZOTOBACTER* AND OTHER MICROBIAL GROUPS IN MULBERRY PLANTATION

S. K. GANGWAR* & K. THANGAVELU**

Regional Sericultural Research Station, Allikuttai P.O., Gandhinagar, Salem - 636 003, Tamil Nadu, India.

To determine the population trend of *Azotobacter* sp. in mulberry plantation and interaction of biotic and abiotic soil factors, the population estimation of fungi, bacteria, actinomycetes and chemical analyses of soil were done before mulberry plantation and at 0, 6, 12, 24 and 36 months after plantation. Population of *Azotobacter*, total fungi, and actinomycetes in the soil of mulberry garden increased up to the second year of mulberry plantation and became static in the subsequent year. Total bacterial population, however, continued to increase till the third year. *Azotobacter* population was adversely influenced by nitrogen and potassium contents but did not show significant correlation with other soil factors like pH, electrical conductivity (EC), organic carbon and phosphorus. The other microbial groups under study showed negative correlation with soil pH and EC but a strong positive correlation with organic carbon. *Azotobacter* population had no relation with other microbial groups though fungi, bacteria and actinomycetes were positively influenced by each other as reflected in their significant correlation.

Keywords : Bio-fertilizer, *Azotobacter*, Microbial population, Soil microbes.

INTRODUCTION

Azotobacter has recently been explored as bio-fertilizer for mulberry plantation (Gangwar and Thangavelu, 1991 ; Nagarajan *et al.*, 1986). This micro-organism being a free living nitrogen fixing bacterium, its growth in soil is influenced by all physical, chemical and biological factors (Subba Rao, 1984).

Further, soil-plant-microbe interaction is a complex phenomenon. Though many fold increase in microbial activities near rhizosphere is noticed when compared with that in the soil devoid of vegetation (Rangaswami, 1988), the actual relationship amongst various physical, chemical and biological factors of soil with a particular microbe or microbial groups in mulberry plantation is not known, more so with *Azotobacter*. As soil conditions undergo changes with agronomic practices and root growth, these factors directly or indirectly influence microbial activities as well. The population studies of these microbial groups in mulberry ecosystem are very limited. Channal *et al.* (1989) reported influence of chemical factors of soil on *Azotobacter* population in Karnataka. It was therefore decided to evaluate the population dynamics of *Azotobacter* vis-à-vis other major microbial groups i.e. fungi, bacteria and actinomycetes in the soil under different age of mulberry and to evaluate interactions of *Azotobacter* with these biotic as also abiotic soil factors.

* Present address: Mulberry Pathology Lab, C. S. R. & T. I., Berhampore - 742 101, Dist. Murshidabad, W. B.

** Present address: Silkworm and Mulberry Germplasm Station (CSB), P. B. No. 44, Hosur - 635 109, Tamil Nadu (India).

MATERIALS AND METHODS

Mulberry variety Kanva-2 was planted in the farm of Regional Sericulture Station, Salem (11°5'N Lat., 78°4'E long.). The soil before planting was alkaline (pH 9.1) with low plant nutrients specially nitrogen and phosphorus (N = 145, P = 4.2 and K = 265 kg/ha). Soil was therefore ameliorated with gypsum @ 4t/ha, sand @ 20 t/ha and red soil @ 20t/ha before planting mulberries. Mulberries were raised through cuttings at 60 cm × 60 cm spacing and recommended agronomic practices (Krishnaswamy, 1968) were followed. Soil samples were collected at 0-20 cm depth from ten fixed spots before soil amelioration and from rhizospheric area of the same spots at 6, 12, 24 and 36 months after planting.

The soil samples were analysed at Soil Testing Laboratory of Tamilnadu Agriculture department, Salem for pH, electrical conductivity, organic carbon, nitrogen, phosphorus, potassium by standard methods (Jackson, 1973 ; Chopra and Kanwar, 1976). Total population of fungi, bacteria, actinomycetes and azotobacter were enumerated by serial dilution plate methods using specific culture media (William and Cross, 1971). The soil suspension dilutions used for plating were 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^5 for fungi, bacteria, actinomycetes and *Azotobacter* respectively. Culture plates were incubated at room temperature (28 to 35° C) for 7 days and colonies developed by then were counted. Data were compiled and analysed to determine the impact of soil factors on the population of these important microbial groups and to study the relationships amongst them particularly with respect to *Azotobacter*.

RESULTS AND DISCUSSION

There was remarkable change in soil conditions with the age of mulberry plantation as evident from reduction in soil pH from 9.1 to 8.3, electrical conductivity from 0.80 to 0.30 and increase in organic carbon in the soil from 0.012 to 0.218% (Table I). These changes were more pronounced during the first year of mulberry plantation and there after the difference was non-significant except for organic carbon which continued to increase up to the second year. Plant nutrients like nitrogen, phosphorus and potassium also increased up to the second year (one year after planting) and declined thereafter, except phosphorus which remained constant during the second and third year and then declined. This may be partially because the amount of nutrients applied during the first year were not fully utilised by mulberry plants at their establishment stage. However, after establishment most of the nutrients applied should have been absorbed by growing mulberry plants. This change in soil factors and nutrient status also influenced the microbial population in the soil and there was a significant increase in the population of total fungi up to the third year; and actinomycetes, bacteria and *Azotobacter* up to the second year after planting. Bacterial population, however, declined after the third year.

Soil pH and electrical conductivity had a negative correlation with all the microbial groups except *Azotobacter* population which had a non-significant correlation. Organic carbon had a positive and highly significant correlation with fungal, bacterial and actinomycetes population but not with *Azotobacter* population. Enhanced activities of fungi, bacteria and actinomycetes during first year of mulberry plantation might be due to change in soil conditions both by soil amelioration and by growing mulberry root system as reflected in decrease in soil pH, EC and increase in organic carbon of soil. *Azotobacter* prefers slightly alkaline pH (Janesan, 1965 ; Rasal *et al.*, 1986) and is also influenced positively by organic carbon (Rangaswami and Sadasivam, 1964 ; Channal *et al.*, 1989). Change in pH and organic carbon contents of soil and mulberry growth definitely influenced the population of *Azotobacter* and other microbial groups (Table II), but their non-significant correlation with *Azotobacter* population might be due to variation in changes of these soil factors with the age of mulberry. Change in organic carbon was not similar to that of soil pH and EC.

Plant nutrients like nitrogen, phosphorus and potassium had different impacts on the microbial population in soil. *Azotobacter* population was influenced negatively by nitrogen and potassium.

Table 1. Soil factors and microbial population at different age groups of mulberry.

Tableau 1. Facteurs pédologiques et populations microbiennes pour différents groupes d'âge du mûrier.

Soil sample	Soil pH	EC (dS/m)	Organic carbon (C %)	Nitrogen (N kg/ha)	Phosphorus (P O 2 kg/5ha)	Potassium (KO 2 kg/ha)	Fungal population ($\times 10^4$ / g)	Bacterial population ($\times 10^5$ / g)	Actinomycetes population ($\times 10^6$ / g)	Azotobacter population ($\times 10^3$ / g)
<i>Echantillon du sol</i>	<i>pH du sol</i>		<i>Carbone organique (C %)</i>	<i>Azote (N kg/ha)</i>	<i>Phosphore (PO 2 kg/5 ha)</i>		<i>Population fongique ($\times 10^4$ / g)</i>	<i>Population bactérienne ($\times 10^5$ / g)</i>	<i>Population actinomycète ($\times 10^6$ / g)</i>	<i>Population Azotobacter ($\times 10^3$ / g)</i>
1. Control (Before soil amendment) 1. <i>Témoin (Avant l'amendement du sol)</i>	9.1	0.80	0.012	195.0	2.3	267.5	1.5	20.5	15.2	0.3
2. Six months after plantation. 2. <i>Six mois après la plantation</i>	8.7	0.74	0.105	207.5	16.3	302.5	11.8	49.3	31.6	5.1
3. One year after plantation 3. <i>Un an après la plantation</i>	8.4	0.45	0.214	317.5	31.5	572.5	75.0	88.8	69.3	2.2
4. Two years after plantation 4. <i>Deux années après la plantation</i>	8.4	0.31	0.251	260.0	31.5	302.5	108.8	87.0	81.3	5.9
5. Three years after plantation 5. <i>Trois ans après la plantation</i>	8.3	0.30	0.218	112.5	18.0	412.5	106.2	109.0	76.0	5.4
CD at 5% CD à 5%	0.2	0.18	0.021	15.1	6.2	20.3	11.2	9.7	11.2	1.3

Nitrogen did not show any relationship with fungal, bacterial and actinomycetes population. Phosphorus influenced fungi and actinomycetes positively and potassium had a positive impact on bacterial population alone. While the significant and negative relationship of nitrogen with Azotobacter is in support of its nitrogen fixing ability, the negative impact of potassium on its population might be due to the interactions of other soil factors. Channal *et al.*, (1989) reported a

Table II. Correlation matrix amongst soil factors and microbial population.

Tableau II. Matrice de corrélation entre les facteurs pédologiques et la population microbienne.

Soil factors & microbial population	Microbial population			
	Fungal population ($\times 10^4$)	Bacterial population ($\times 10^5$)	Actinomycetes population ($\times 10^6$)	Azotobacter population ($\times 10^3$)
Facteurs pédologiques & population microbienne	Population microbienne			
	Population fongique ($\times 10^4$)	Population bactérienne ($\times 10^5$)	Population actinomycète ($\times 10^6$)	Population Azotobacter ($\times 10^3$)
Soil pH / pH du sol	- 0.776**	- 0.831**	- 0.784**	- 0.317
Electric conductivity (ds/m) Conductivité électrique (ds/m)	- 0.997**	- 0.935**	- 0.975**	- 0.378
Organic carbon (C %) Carbone organique (C %)	0.920**	0.899**	0.931**	0.385
Nitrogen (N kg/ha)	- 0.210	- 0.340	- 0.049	- 0.510*
Phosphate (P kg/ha)	0.468*	0.343	0.618**	- 0.031
Potassium (K kg/ha)	0.272	0.480**	0.376	- 0.564*
Fungal population ($\times 10^4$) Population fongique ($\times 10^4$)		0.922**	0.981**	0.380
Bacterial population ($\times 10^5$) Population bactérienne ($\times 10^5$)			0.913**	0.328
Actinomycetes population ($\times 10^6$) Population actinomycète ($\times 10^6$)				0.324

N.B.: Stars indicate significant level (* for $P = 0.05$ and ** for $P = 0.001$) / Les étoiles indiquent le niveau de signification (* pour $P = 0,05$ et ** pour $P = 0,01$).

non-significant relationship of *Azotobacter* with pH, EC and nitrogen in Karnataka soils and Gupta et al., (1977) found a non-significant relationship of *Azotobacter* population with phosphorus. The present report confirms the above findings.

Various microbial groups except *Azotobacter* showed highly significant and positive correlations with each other. The reason for this relationship might be due to similar influence of soil conditions on these microbial groups rather than the synergistic relationship amongst them. The relationship of *Azotobacter* population with other three microbial groups was non-significant which might be due to different growth requirements for *Azotobacter* and other microbial groups particularly soil pH and nitrogen contents. Enhanced microbial activities near rhizosphere is a well known phenomenon. However, slightly different growth requirements and soil conditions provide scope for exploring *Azotobacter* as bio-fertilizer without adverse effect on other microbial groups.

REFERENCES

- CHANNAL K. T., Alagawadi A. R., Bharamagoudar T. D., Udupa S. G., Patil L. and Mannikeri I.M. (1989) *Azotobacter* population as influenced by soil of North Karnataka. *Curr. Sci.*, 58, 70-71.
- CHOPRA S. L., KANWAR J. S. (1976) *Analytical Agricultural Chemistry*. Kalyani Publ., New Delhi, 180-244 pp.
- GANGWAR S. K., THANGAVELU K. (1991) Evaluation of biofertilizers for establishment of mulberry (*Morus alba* L.). *Sericologia* 32(2), 173-181.
- GANGWAR S. K., THANGAVELU K. (1995) Varietal and seasonal incidence of bacterial blight disease of mulberry caused by *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens. *Indian J. Seric.* 34(2), 100-113.
- GUPTA R. D., JHA K. K., SETH A. S., SAHARAN, G. S. (1977) Presence of *Azotobacter* in relation to physico-chemical properties of some North Indian soils. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 86(6), 389-395.
- JACKSON M. L. (1973) *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi, pp 183-192.
- JANESAN H.L. (1965) Non-symbiotic nitrogen fixation. *Amer. Soc. Agron. Monogr.*, 10, 436-742.
- KRISHNASWAMY S. (1986) Mulberry cultivation in South India. *Bull. No. 1*, Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, 16 pp.
- NAGARAJAN P., RADHA N. B., OBLISWAMI G. (1986) Influence of biofertilizer application in the mulberry field on economic characters of silkworm, *Bombyx mori* L. *Proc. National Seminar on Prospects and problems of Sericulture in India*, March 27-30, Bangalore, 9pp.
- RANGASWAMI G. (1988) Soil plant microbe interrelationships. *Indian Phytopathol.*, 41(2), 165-172.
- RANGASWAMI G., SADASIVAM K. V. (1964) Studies on occurrence of *Azotobacter* in some soil types. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 1(12), 43-49.
- RASAL P. H., KALLBHOUR H. B., PATIL P. L. (1986) *Madras Agricul. J.*, 73, 234.
- SUBBA RAO N.S. (1984) *Current Development on Biological Nitrogen Fixation*. Oxford IBH Publ., New Delhi, 277pp.
- WILLIAM S. J., CROOS J. (1971) *Methods in microbiology*. Vol. IV. Acad Pres, New York.

DYNAMIQUE DES POPULATIONS DES *AZOTOBACTER* ET D'AUTRES GROUPES MICROBIENS DANS LES PLANTATIONS DE MURIER

S. K. GANGWAR*¹ & K. THANGAVELU**²

Regional Sericultural Research Station, Allikuttai P. O., Ghandhinagar, Salem -636 003, Tamil Nadu, Inde.

*Afin de déterminer les tendances des populations d'*Azotobacter* sp. dans les plantations de mûrier et l'interaction entre les facteurs biotiques et abiotiques du sol, on a estimé les populations de champignons, bactéries, et actinomycètes et effectué des analyses chimiques du sol avant la plantation des mûriers et 0, 6, 12, 24 et 36 mois après la plantation. Les populations d'*Azotobacter*, de champignons et d'actinomycètes présents dans le sol des mûraies augmentent jusqu'à la deuxième année de plantation puis se stabilisent l'année suivante. L'ensemble de la population bactérienne, cependant, continue à augmenter jusqu'à la troisième année. L'azote et le potassium ont une influence négative sur la population d'*Azotobacter* mais n'ont pas de corrélation significative avec les autres caractéristiques du sol tels que le pH, la conductivité électrique (EC), le carbone organique et le phosphore. Les autres groupes microbiens étudiés montrent une corrélation négative avec le pH du sol et l'EC mais une forte corrélation positive avec le carbone organique. La population d'*Azotobacter* n'a pas de relation avec d'autres groupes microbiens bien que les champignons, les bactéries et les actinomycètes soient influencés de manière positive entre eux.*

INTRODUCTION

Les *Azotobacter* ont récemment été étudiés comme engrais biologiques dans les plantations de mûrier (Gangwar et Thangavelu, 1991 ; Nagarajan et coll., 1986). Ce micro-organisme étant une bactérie libre fixant l'azote, sa croissance dans le sol est influencée par tous les facteurs physiques, chimiques et biologiques (Subba Rao, 1984).

De plus, l'interaction sol/plante est un phénomène complexe. Bien que l'activité microbienne soit multipliée près de la rhizosphère par rapport à celle du sol où la végétation est absente (Rangaswami, 1988), la relation entre les différents facteurs physiques, chimiques et biologiques du sol en ce qui concerne des microbes particuliers ou des groupes microbiens dans les mûraies n'est pas connue et plus encore pour les *Azotobacter*. Les conditions de sol changeant en fonction des pratiques agronomiques et de la croissance de la racine, ces facteurs influencent aussi l'activité microbienne directement ou indirectement. Les études de population de ces groupes microbiens dans l'écosystème du mûrier sont en nombre limité. Channal et coll. (1989) ont observé que les facteurs chimiques ont une influence sur la population d'*Azotobacter* du Karnataka. Nous avons donc décidé d'évaluer la dynamique de population des *Azotobacter* par rapport à d'autres groupes microbiens du sol comme

* Adresse actuelle : Mulberry Pathology Lab, C.S.R.T.I, Berhampore- 742 101, Dist. Murshidabad, W. B.

**Adresse actuelle : Silkworm and Mulberry Germplasm Station (CSB), P. B. No. 44, Hosur - 635 109, Tamil Nadu (Inde).

les champignons, les bactéries et actinomycètes chez le mûrier à des âges différents et d'évaluer les interactions entre les *Azotobacter* et les facteurs biotiques et abiotiques.

MATERIELS ET METHODES

La variété de mûrier Kanva-2 a été plantée dans l'exploitation de la *Regional Sericulture Station*, Salem (11° 5' Lat. N, 78° 4' Long. E). Le sol avant les plantations était alcalin (pH 9,1) et pauvre en nutriments pour plantes en particulier en azote et en phosphore (N= 145, P= 4,2 et K= 265 kg/ha). Le sol a donc été amélioré avec du sulfate de chaux @ 4t/ha, du sable @ 20t/ha et du sol rouge @ 20t/ha avant la plantation des mûriers. Les mûriers ont été cultivés à partir de boutures à un espacement de 60 cm × 60 cm et en suivant les pratiques agronomiques recommandées (Krishnaswamy, 1968). Les échantillons de sol sont prélevés à une profondeur de 0-20 cm en 10 points précis avant l'amendement du sol et dans la zone de la rhizosphère aux mêmes endroits 6, 12, 24 et 36 mois après la plantation. Les échantillons de sol ont été analysés au *Soil Testing Laboratory* du *Tamilnadu Agriculture Department*, Salem pour évaluer le pH, la conductivité électrique, le carbone organique, l'azote, le phosphore, le potassium par les méthodes standard (Jackson, 1973 ; Chopra et Kanwar, 1976). Les populations totales en champignons, bactéries, actinomycètes et *Azotobacter* ont été mesurées par les méthodes de plaque en série en utilisant des milieux de culture spécifiques (William et Cross, 1971). Les dilutions de sol en suspension utilisées pour l'étalement s'élevaient à 10^4 , 10^6 , 10^5 et 10^3 pour les champignons, les bactéries, les actinomycètes et les *Azotobacter* respectivement. Les plaques de culture ont été incubées à température ambiante (28 à 35° C) pendant 7 jours et les colonies s'étant développées ont été comptées. Les données sont regroupées et analysées afin de déterminer l'impact des facteurs du sol sur la population de ces importants groupes microbiens et d'étudier les relations entre eux en particulier par rapport aux *Azotobacter*.

RESULTATS ET DISCUSSION

On observe des changements remarquables concernant les conditions pédologiques en fonction de l'âge du plant de mûrier, comme en témoigne la réduction du pH de 9,1 à 8,3, de la conductivité électrique de 0,80 à 0,30 et l'augmentation du carbone organique dans le sol de 0,012 à 0,218 % (Tableau I). Ces changements sont plus prononcés pendant la première année de plantation du mûrier, la différence est ensuite insignifiante excepté pour le carbone organique qui continue à augmenter jusqu'à la deuxième année. Les nutriments des plantes comme l'azote, le phosphore et le potassium augmentent aussi jusqu'à la deuxième année (un an après la plantation) et baissent après, le phosphore excepté, demeurant constant pendant la deuxième et troisième année et baissant ensuite. Cela est peut-être dû à ce que la quantité de nutriments administrée pendant la première année n'a pas été complètement utilisée par les plants de mûrier à la période d'établissement. Cependant, après leur racinement, la plupart des nutriments administrés auraient dû être absorbés par les plants de mûrier en croissance. Ce changement des facteurs du sol et de l'état des nutriments influence aussi la population microbienne dans le sol et on enregistre une augmentation significative de la population totale en champignons jusqu'à la troisième année et des actinomycètes, des bactéries et des *Azotobacter* jusqu'à la deuxième année de plantation. La population bactérienne baisse toutefois après la troisième année.

Le pH du sol et la conductivité électrique donnent une corrélation négative avec tous les groupes microbiens excepté avec la population *Azotobacter* qui donne une corrélation non-significative. Le carbone organique donne une corrélation positive et hautement significative avec la population fongique, bactérienne et actinomycète mais pas avec la population *Azotobacter*. L'accroissement de l'activité chez les champignons, les bactéries et les actinomycètes pendant la première année de plantation des mûriers est peut-être dû au changement des conditions pédologiques provenant de l'amélioration du sol et à la croissance des racines du mûrier comme en témoignent la diminution du pH, de l'EC et l'augmentation du carbone organique dans le sol. Les *Azotobacter* préfèrent un pH

légèrement alcalin (Janesan, 1965 ; Rasal et coll., 1986) et sont également influencés de manière positive par le carbone organique (Rangaswami et Sadasivam, 1964 ; Channal et coll., 1989). Les changements des valeurs de pH et de teneurs en carbone organique du sol et la croissance du mûrier influencent assurément la population d'*Azotobacter* et des autres groupes microbiens (Tableau II), mais leur corrélation non-significative avec la population azotobactérienne est peut-être due à la variation des changements de ces facteurs pédologiques en fonction de l'âge du mûrier. Pour le carbone organique le changement n'est pas similaire à celui du pH et de l'EC.

Les nutriments des plantes comme l'azote, le phosphore et le potassium ont des impacts différents sur la population microbienne du sol. L'azote et le potassium influencent la population *Azotobacter* de manière négative.

L'azote n'a pas de relation avec les populations fongique, bactérienne et actinomycète. Le phosphore a une influence sur les champignons et les actinomycètes et le potassium a un impact positif sur la population bactérienne seule. Alors que la relation significative et négative de l'azote avec les *Azotobacter* prouve leur capacité à fixer l'azote, l'impact négatif du potassium sur la population est peut-être dû à l'interaction d'autres facteurs pédologiques. Channal et coll., (1989) ont observé une relation non-significative entre les *Azotobacter* et le pH, l'EC et l'azote présents dans le sol, au Karnataka et Gupta et coll., (1977) ont observé une relation non-significative de la population d'*Azotobacter* avec le phosphore. L'étude actuelle confirme ces observations.

Plusieurs groupes microbiens, les *Azotobacter* exceptés, présentent des corrélations hautement significatives et positives entre eux. La raison de cette relation vient peut-être plus de l'influence semblable des conditions pédologiques sur ces groupes microbiens que d'une relation synergique entre eux. La relation de la population d'*Azotobacter* avec trois autres groupes microbiens est non-significative ce qui est peut-être due à des besoins de croissance différents entre les *Azotobacter* et les autres groupes microbiens en particulier concernant le pH du sol et le contenu en azote. L'augmentation de l'activité microbienne près de la rhizosphère est un phénomène bien connu. Toutefois, les besoins de croissance et en conditions pédologiques légèrement différents devraient permettre d'explorer les *Azotobacter* comme engrais biologique sans effet adverse sur les autres groupes microbiens.

ADVENTITIOUS SHOOT FORMATION AND PLANT REGENERATION FROM CALLUS CULTURES OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.)

K. KATHIRAVAN, A. GANAPATHI & A. SHAJAHAN

Department of Bio-technology, School of Life Sciences Bharathidasan University, Tiruchirapalli
620 024 Tamilnadu, India.

Callus cultures were initiated from hypocotyl, petiole, young and mature leaves and stem segments of Morus alba on MS basal medium supplemented with various auxins like 2,4-D, NAA and IAA in combination with BAP. Higher frequency of callusing was obtained on IAA and BAP supplemented medium. Adventitious shoot buds were induced from hypocotyl callus, but no response was observed from calli of other explant sources. Maximum frequency of adventitious shoot bud development was observed within 4-5 weeks on MS medium supplemented with NAA (0.50mg/l) and BAP (0.75mg/l). The regenerated plantlets were then sub-cultured on root induction medium fortified with IBA and later hardened.

Keywords: Mulberry, Callus, Adventitious shoot.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba*) cv MR₂ is a perennial woody plant of considerable economic utility for its foliage, which constitutes the chief food for silkworm (*Bombyx mori* L.). It is conventionally propagated by stem cuttings. Since mulberry is a woody tree, its response to experimental manipulation is also slow. In recent years, tissue culture technique offers new avenues in the improvement of many plant species, where we can screen and manipulate plants in much shorter period. Initially mulberry tissue culture was concentrated on multiplication of shoots, using nodal segments from matured tree. Attention was then shifted to adventitious shoot bud formation. Direct regeneration from seedling explants like leaf, cotyledon and hypocotyl was achieved. Organogenesis through callus pathway is of special significance, since the regeneration is from a single cell which is basic and essential for *in vitro* genetic manipulation studies. Till-date, only limited work is available on regeneration of mulberry through callus pathway and there are difficulties in reproducing this protocol on other cultivars. Hence, the present work was undertaken to define optimal culture conditions for higher frequency of plant regeneration from callus.

MATERIALS AND METHODS

Mature seeds of *Morus alba* cv MR₂ were collected from selected plus trees grown in the Dept. of Biotechnology experimental garden Bharathidasan university, Tiruchirappalli, Tamilnadu, India. Seeds were germinated aseptically on MS(Murashige and Skoog, 1962) medium. Mature leaf and internodal segments were collected from one year old plants.

Hypocotyl, young leaf and petiole segments were excised from 20-25 days old seedling. The explants were cultured on MS medium containing various concentrations and combinations of auxins like indole-3-acetic acid (IAA), 2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), naphthalene acetic acid

(NAA) and cytokinin- 6 -benzylaminopurine (BAP), casein hydrolysate 300mg/l, coconut water 200ml/l and PVP(polyvinyl pyrrolidone) 100mg/l for callus induction. The explants were incubated in diffused light of 1500 lux at $25 \pm 2^\circ \text{C}$ and 65% relative humidity. The pH of the media were adjusted to 5.8 before autoclaving. A minimum of 50 cultures were raised for each treatment.

One month after the initiation of callus, they were pruned without any trace of explant and then sub-cultured in LS(Linsmaier and Skoog,1965) medium amended by NAA (0-1mg/l) individually or in combination with BAP (0-1mg/l). Initiation of adventitious buds were noticed in 40 days old greenish nodular calli obtained from the hypocotyl segments. Callus samples were fixed in FAA (Formalin: Acetic acid: 95% Ethanol 5:5:90) for histological studies. These were dehydrated in tertiary butanol series and embedded in paraffin wax and sectioned in 10 μm thickness and were stained with haematoxylin.

Regenerated shootlets measuring 6-8cm were excised and cultured on MS basal medium containing indole-3-butyric acid (IBA 0.5mg/l). Plantlets with well developed roots were taken out from culture vessel. After washing their roots in running water, they were transferred to pots containing equal portion of sterile vermiculite and soil and kept under polythene cover. The hardened plantlets were transferred to the nursery.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Callus induction:

Callusing ability of different explants i.e. hypocotyl, young leaf, mature leaf, internodal segment and petiole were evaluated on MS medium supplemented with various auxins like IAA,2,4-D NAA and cytokinin - BAP. Synergistic action of auxin and cytokinin for successful callus induction is pronounced in dicots. Hypocotyl and internodal segments showed callus induction seven days after inoculation; whereas, the petiole, mature and young leaf showed callus initiation only after 10th day. The callus produced in the latter pathway was dark brown, hard and compact with rhizogenesis. The hypocotyl and internodal segments were found to be highly efficient explant for callus induction followed by, mature leaf, young leaf and petiole. The calli derived from different explant showed variation in their anatomical and morphological features.

The nature of calli varied with various hormone combination (Table I). Higher amount of yellow compact and nodular calli were obtained from hypocotyl and internodal explant on the MS medium containing 2,4-D alone, but addition of BAP resulted in greenish compact or nodular calli. Hunault (1989) reported that cytokinin tends to increase compactness and green colour of tissues. Our observation also corroborates this view. Comparatively hypocotyl callus was found to be more responsive than the internodal calli (Table I). Mature and young leaves produced different type of calli on the medium supplemented with either 2,4-D/IAA/NAA. However 2,4-D induced more quantity than the other two treatments. Combination of BAP (0.5mg/l) with the aforesaid auxins produced greenish nodular calli (Tab-I). Petiole explants showed good callusing response on 2,4-D - BAP combination(Tab-I).

Regeneration was obtained only from the green compact semifriable calli derived from hypocotyl explant. This is in accordance with the findings of Ghugale *et al* (1971), Oka and Okuma (1981) and Kim *et al* (1985). Mendoza and Futsudhara (1990) noticed development of shoot bud from greenish nodular and compact calli. Histology of these calli called that large proportion of cells with dense cytoplasm, rich starch granules and prominent nuclei. Warrag (1989) also observed thin walled cells with rich granules, dense cytoplasm and prominent nuclei in the embryogenic callus. Hard and compact calli showed large amount of tracheary elements. Callus from mature and young leaves showed large number of vacuolated cells.

2. Adventitious bud formation:

Table 1. Callus colour, mass, compactness and root development from different types of explants on various auxins concentration and bap after 45 days.

Tableau 1. Couleur du cal, masse, compacité et développement de la racine à partir de différents types d'explants sur diverses concentrations d'auxines et de benzylamino purine (bap) après 45 jours.

Hormone conc. Auxin	Hypocotyl				Young Leaf/			Mature Leaf			Petiole			Internode		
Cytotokinin	Colour	Mass	Root		Colour	Mass	Root	Colour	Mass	Root	Colour	Mass	Root	Colour	Mass	Root/
Conc. d'hormones	Hypocotyle				Jeune feuille			Feuille mature			Pétiole			Entre-nœud		
Auxine cytokinique	Couleur	Massé	Racine		Couleur	Masse	Racine	Couleur	Masse	Racine	Couleur	Masse	Racine	Couleur	Masse	Racine
2,4-D	BAP															
0.00	0.00	-	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.50	0.00	BC	1	0	GC	2	0	0	0	0	0	0	0	BC	2	1
1.00	0.00	BC	3	0	GC	3	0	GC	2	1	GC	3	0	BN	2	1
1.50	0.00	BN	4	0	0	0	0	0	0	0	GC	2	1	BC	4	0
2.00	0.00	BN	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	BC	2	0
3.00	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.50	0.50	BC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	PYC	1	0
1.00	0.50	PYC	4	0	GC	1	0	0	0	0	GN	1	0	PYN	2	0
1.50	0.50	GYC	4	0	GN	3	0	GC	3	0	GC	4	0	PGC	2	0
2.00	0.50	BN	5	1	GN	1	1	GN	1	1	BC	1	1	GC	4	0
3.00	0.50	BN	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	GC	3	0
IAA	BAP															
0.50	0.00	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	YC	1	0
1.00	0.00	WYC	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	BN	2	0
1.50	0.00	YC	2	0	GN	2	0	GC	1	0	BC	1	0	GC	4	0
2.00	0.00	YC	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	BC	5	0
3.00	0.00	YC	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.50	0.50	WC	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	GN	1	0
1.00	0.50	YF	4	0	BC	4	0	GC	3	1	GC	2	0	GN	2	0
1.50	0.50	YF	5	0	BC	3	0	GN	3	0	GN	4	0	YGN	5	0
2.00	0.50	YN	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	YC	6	0
3.00	0.50	BN	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	BC	3	0

Continued overleaf / Suite page suivante

Table 1 (continued) / Tableau 1 (suite)

Hormone conc. Auxin	Hypocotyl			Young Leaf			Mature Leaf			Petiole			Internode		
Cytotokinin	Colour	Mass	Root	Colour	Mass	Root	Colour	Mass	Root	Colour	Mass	Root	Colour	Mass	Root/
Concentration d'hormones Auxine cytokinine	Hypocotyle			Jeune feuille			Feuille mature			Pétiole			Entre-noeud		
	Couleur	Masse	Racine	Couleur	Masse	Racine	Couleur	Masse	Racine	Couleur	Masse	Racine	Couleur	Masse	Racine
NAA	BAP														
0.50	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.00	0.00	YC	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	YC	1	1
1.50	0.00	BC	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	GC	1	0
2.00	0.00	BC	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	GC	3	1
3.00	0.00	BC	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	BC	2	1
0.50	0.50	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.00	0.50	YC	1	0	GN	2	1	GN	2	1	YC	1	GN	1	0
1.50	0.50	BC	1	1	GC	3	1	0	0	0	YC	3	GC	3	1
2.00	0.50	BC	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	BC	2	1
3.00	0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

B=Brown/Marron, C=Compact/Compact, N=Nodular/Nodulaire, P=Pale/Pâle, Y=Yellow/Jaune, W=White/Blanc, F=Friable/Friable, G=Green/Vert.

Scored in a scale of 1.6 with 1 indicates less, and 6 more, 0 indicates no callus was observed.

Résultat dans une échelle de 1.6 : 1 indique moins, 6 indique plus et 0 signifie qu'aucun cal n'a été observé.

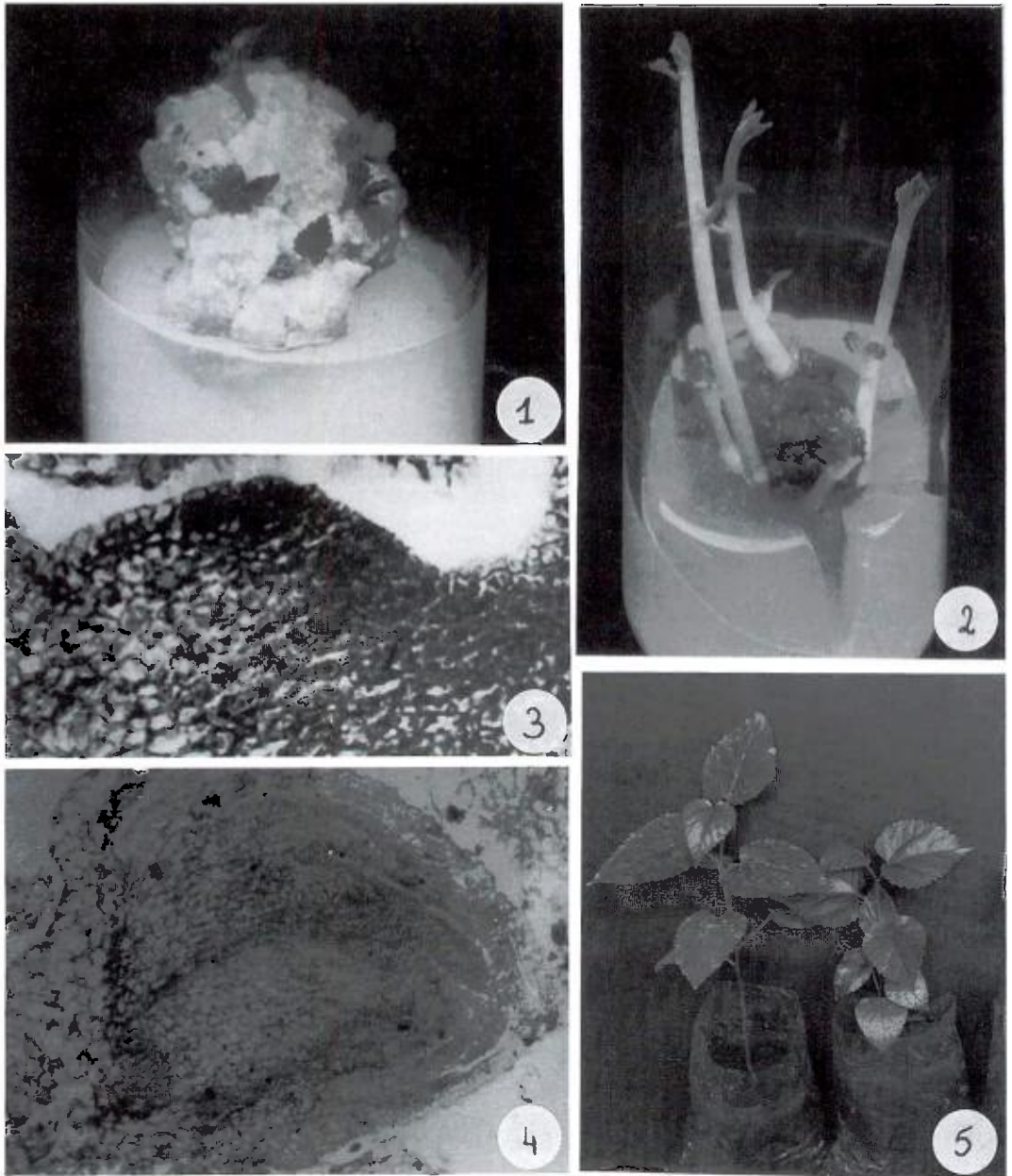


Fig. 1. Shoot proliferation from hypocotyl. Fig 2. Shoot elongation from hypocotyl callus. Figures 3 & 4. Shoot primordia developed from hypocotyl callus. Fig 5. Plantlet at nursery stage.

Fig 1. Prolifération de pousses à partir du cal de l'hypocotyle. Fig 2. Allongement des pousses à partir du cal de l'hypocotyle. Figures 3 & 4. Primordia de la tige obtenues à partir du cal de l'hypocotyle. Fig 5. Plantule prête à être utilisée en pépinière.

In the present study, the yellow greenish nodular and compact calli obtained from aforesaid explant were cultured on LS medium for regeneration. After 3 to 4 weeks, slight protuberances appeared on the surface of the hypocotyl callus (Fig. 1), when subcultured on the medium containing low levels of NAA (0.5mg/l) and high level of BAP (0.75mg/l; Table II). At the end of the 6th week, the protuberances grew into plantlets (Fig. 2). Among the different types of calli investigated, adventitious shoot formation occurred only from hypocotyl callus. Lakshmi Sita *et al* (1979) and Oka *et al* (1982) also observed in *Eucalyptus* species that hypocotyl was more suitable for regeneration of plantlets. This may be due to the juvenile nature of the explant source.

Histological studies indicated that the shoot bud primordia formation was initiated from the epidermal layer. (Fig. 3). Initially meristematic cells appeared along the epidermal layers and mitotic activity was localized in epidermal and sub epidermal layers. Similar results were also observed in mulberry by Jain and Datta (1992). The meristematic zones then developed into buds and formed adventitious shoot buds within 4 to 6 weeks (Fig. 4).

Table II. Plant regeneration from hypocotyl callus of *Morus alba*.

Tableau II. Régénération de plantes à partir du cal hypocotyle de Morus alba.

Growth Hormones		% of culture showing response	Frequency of shoot	Average Shoot length	Average no. of shoots per culture
<i>Hormones de croissance</i>		<i>% de cultures montrant une réaction</i>	<i>Fréquence des pousses</i>	<i>Longueur moyenne des pousses</i>	<i>Nombre moyen de pousses par culture</i>
NAA	BAP				
0.0	0.0	0	0	0	0
0.50	0.25	45	40.00±4.6	3.1±0.7	2.83±1.1
0.50	0.50	80	78.16±4.6	7.6±1.9	6.16±1.1
0.50	0.75	91	92.75±3.1	12.5±4.8	4.46±1.1
0.50	1.00	60	56.30±4.2	4.5±1.0	1.83±1.1
0.50	1.50	0	0	0	0
0.50	2.00	0	0	0	0

Mean ± standard error / *Moyenne ± écart type.*

Data represent average of six replicates / *Les données représentent une moyenne de six répétitions.*

3. Roots induction and transplantation:

The well developed shootlets (6 - 8cm) were transferred to the medium containing IBA (0.75mg/l) for root induction. Our earlier observation also showed that low concentration of IBA is enough for root induction (Kathiravan *et al* 1995). 87% rooting were recorded in 15 to 20 days. The rooted plantlets were transferred to soil and vermiculite (1:1) (Fig. 5). After 4th week, 92% survival was

recorded. The plantlets were hardened and successfully transplanted to the field. The above study has thus demonstrated a reproducible protocol for plant regeneration from hypocotyl derived callus. The results of this study will go a long way in genetic manipulation studies in mulberry.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Central Silk Board, Bangalore for financial assistance under National sericulture Project.

REFERENCES

- GHUGALE DD., KULKARNI DD., NARASIMAN R. (1971) Effect of Auxins & Gibberellic acid on growth & Differentiation of *Morus alba* & *Populus nigra* Tissues in vitro. Indian J.Exp. Biol., 9, 381 - 384.
- HUNAUULT G., DESMAREST P., DU-MANOIR J. (1989) *Foeniculum vulgare* Miller, cell culture regeration and the protection of anethole. In: Bio-Technology in Agriculture and forestry: Medicinal and aromatic plants, (eds) YPS. Bajaj, Springer-Verlage Berline, Heidelberg. pp 185 - 212.
- JAIN AK., DATTA RK. (1992) Shoot organogenesis and Plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Kodiz). Factors influencing morphogenetic potential in callus cultures, Plant cell Tiss. Org. cult., 29, 43 - 50.
- KATHIRAVAN K., SHAJAHAN A., GANAPATHI A. (1995) Evaluation of *In vitro* responce of mulberry genotypes. Sericologia, 35 (2), 305 - 317.
- KIM HR., PATEL KR., THORPE TA. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot. Gaz., 146, 335-340.
- LAKSHMI SITA G. (1979) Morphogenesis and plant regeneration in hypocotyl callus cultures of *Euclyptus*. Plant sci. lett., 214 : 63-65.
- LINSMAIER EM., SKOOG F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco culture. Physiol. plant., 18, 100-127.
- MENDOZA AB., FUTSUDHARA Y. (1990) Varietal differences on plant regeneration by tissue culture in mung bean *Vigna radiata* (L.) wilczek. Japan.J.Breed., 40, 457-467.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. plant., 15, 473-497.
- OKA S., OHYMA K. (1981) *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*) Can. J. Bot., 59, 68-74.
- OKA S., YEUNG EC., THORPE TR. (1982) Shoot Formation in *Eucalyptus globulus* hypocotyl explant. Newzealand J. Fer. Sci., 12 (3):501 - 509.
- WARRAG E. (1989) Recent progress in tissue culture for *Eucalyptus* species and implication for genetic improvement In: proc 9th S. for Biomass work shop. Daniel. R.A., W.F. Watson, I. Winston savelle (eds) Biloxi, MI. Mississippi state University pp-71-80.

FORMATION DE POUSSES ADVENTIVES ET REGENERATION DE PLANTS A PARTIR DE CULTURES DE CALS DE MURIER (*MORUS ALBA L.*)

K. KATHIRAVAN, A. GANAPATHI & A. SHAJAHAN

Department of Bio-technology, School of Life Sciences Bharathidasan University, Tiruchirappalli
620 024 Tamilnadu, Inde.

*Les cultures de cals sont entreprises à partir de l'hypocotyle, du pétiole, des feuilles jeunes et mûres et des segments de tiges du **Morus alba** sur le milieu MS additionné de diverses auxines comme 2,4-D, NAA et IAA combinés avec BAP. La fréquence plus élevée de cals est obtenue sur le milieu IAA et BAP. Les bourgeons de pousses adventives sont induits à partir du cal hypocotyle, mais aucune réaction n'a été observée à partir de cals d'autres sources d'explants. La fréquence maximale de développement des bourgeons de pousses adventives est observée dans une période allant de quatre à cinq semaines sur le milieu MS additionné de NAA (0,50mg/l) et de BAP (0,75mg/l). Les plantules régénérées sont ainsi sous-cultivées sur le milieu d'induction des racines avec IBA et plus tard renforcées.*

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba*) cv MR₂ est un plant vivace ligneux d'une utilité économique considérable pour son feuillage, ce dernier constituant la principale nourriture pour le ver à soie (*Bombyx mori L.*). Il est banalement propagé par bouturage. Etant donné que le mûrier est un arbre ligneux, sa réaction à la manipulation expérimentale est aussi très lente. Ces dernières années, la technique de la culture de tissu offre de nouvelles ouvertures dans l'amélioration de plusieurs espèces de plantes, où il est possible de trier et de manipuler les plants dans une période de temps plus courte. Au commencement, la culture de tissu du mûrier a été concentrée sur la multiplication des pousses, utilisant des segments nodaux d'arbres mûrs. Ensuite, l'attention s'est portée sur la formation des bourgeons de pousses adventives. La régénération directe à partir d'explants de plantules tels que la feuille, le cotylédon et l'hypocotyle a été obtenue. L'organogénèse à partir du cal est d'une importance particulière, puisque la régénération provient d'une cellule unique ce qui est fondamental et essentiel pour les études de manipulations génétiques *in vitro*. Jusqu'à maintenant, le travail disponible sur la régénération du mûrier par le cal est limité et il y a des difficultés à reproduire ce protocole sur d'autres variétés cultivées. Par conséquent, le présent travail a été entrepris pour définir les conditions de culture optimales pour obtenir une fréquence plus élevée de la régénération du plant à partir du cal.

MATERIELS ET METHODES

Les graines mûres du *Morus alba* cv MR₂ ont été recueillies à partir d'arbres sélectionnés dans le jardin du Département expérimental biotechnologique de l'Université de Bharathidasan, Tiruchirappalli, Tamilnadu, Inde. Les graines ont germé en milieu aseptique MS (Murashige et Skoog, 1962). Les feuilles mûres et les segments internodaux ont été recueillis à partir de plants âgés d'un an.

L'hypocotyle, les feuilles mûres et les segments de pétiole ont été excisés à partir de jeunes plants âgés de 20-25 jours. Les explants ont été cultivés sur le milieu MS contenant diverses concentrations et combinaisons d'auxines comme l'acide indole-3 acétique (IAA), l'acide dichlorophénoxyacétique 2, 4, l'acide naphthalène acétique (NAA) et la cytokinine-6-benzylamino purine (BAP), l'hydrolysate de caséine 300 mg/l, l'eau de noix de coco 200 ml/l et le PVP (polyvinyl pyrrolidone) 100 mg/l pour l'induction de cal. Les explants sont incubés sans une lumière diffuse de 1500 lux à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et 65 % d'humidité relative. Les pH des milieux sont ajustés à 5,8 avant autoclavage. Un minimum de 50 cultures est cultivé pour chaque traitement. Un mois après le début du cal, elles sont taillées sans aucune trace d'explants puis sous cultivées dans le milieu LS (Linsmaier and Skoog, 1965) supplémenté en NAA (0-1 mg/l) seul ou en combinaison avec BAP (0-1 mg/l). Le début des pousses adventives est visible dans les cals nodulaires verdâtres de 40 jours obtenu à partir de segments hypocotyles. Des échantillons de cals sont fixés dans FAA (solution de formaldéhyde : acide acétique : Ethanol 5 : 5 : 90) pour des études histologiques. Ils sont déshydratés dans une série de butanol tertiaire, inclus dans de la paraffine et sectionnés en coupes de 10 μm d'épaisseur et colorés avec de l'hématoxyline.

Les petites pousses régénérées mesurant 6-8 cm sont excisées et cultivées sur le milieu de base MS contenant de l'acide indole-3 butyrique (IBA 0.5 mg/l). Les petits plants avec les racines bien développées sont retirés des flacons de culture. Une fois leurs racines lavées dans de l'eau courante, ils sont transférés dans des pots contenant une portion égale de vermiculite et de terre stérile et conservés sous couverture de polyéthylène. Les plantules solides sont transférées vers la pépinière.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Induction de cals:

La capacité à former un cal des différents explants c'est-à-dire l'hypocotyle, la feuille jeune, la feuille mûre, le segment internodal et le pétiole est évaluée sur le milieu MS additionné de diverses auxines telles que IAA, 2,4-D NAA et la cytokinine - BAP. L'action synergique de l'auxine et de la cytokinine pour une induction du cal réussie est forte chez les dicots. Chez les segments de l'hypocotyle et internodulaires, l'induction du cal est visible sept jours après l'inoculation ; tandis que le pétiole, les feuilles mûres et jeunes montrent un début de cal seulement après le dixième jour. Le cal produit dans le dernier cas est noir foncé, dur et compact avec une rhizogénèse. Il est montré que l'hypocotyle et les segments internodulaires sont des explants très efficaces pour l'induction du cal suivis par la feuille mûre, la feuille jeune et le pétiole. Les cals provenant de différents explants montrent une variation dans leurs caractéristiques anatomiques et morphologiques.

La nature du cal varie avec la combinaison de diverses hormones (Tableau I). Une quantité plus élevée de cals nodulaires compacts jaunes est obtenue à partir d'explants d'hypocotyles et internodulaires sur le milieu MS contenant 2,4-D seul, mais l'ajout de BAP conduit à des cals verdâtres compacts ou nodulaires. Hunault (1989) rapporte que la cytokinine tend à augmenter la compacité et la couleur verte des tissus. Notre observation corrobore aussi cette opinion. Comparativement le cal d'hypocotyle est plus sensible que le cal internodal (Tableau I). Les feuilles mûres et jeunes produisent différentes sortes de cals sur le milieu additionné soit de 2,4-D soit de IAA soit de NAA. Néanmoins, 2,4-D provoque une quantité supérieure aux deux autres traitements. La combinaison du BAP (0.5 mg/l) avec les auxines susmentionnées produit des cals nodulaires verdâtres (Tableau I). Les explants de pétioles montrent une bonne réaction à la formation de cals sur la combinaison 2,4-D-BAP (Tableau I).

La régénération est obtenue uniquement à partir de cals semifriables compacts verts dérivés d'explants hypocotyles. Ceci est en accord avec les découvertes de Ghugale et coll. (1971), Oka et Okuma (1981) et Kim et coll. (1985). Mendoza et Futsudhara (1990) remarquent le développement de bourgeons de pousses à partir de cals compacts et nodulaires verdâtres. L'histologie de ces cals montre une large proportion de cellules avec un cytoplasme dense, des granules d'amidon et des noyaux proéminents. Warrag (1989) observe aussi de fines cellules entourées de riches granules, un

cytoplasme dense et des noyaux proéminents dans les cals embryogéniques. Des cals durs et compacts présentent une grande quantité d'éléments trachéens. Les cals provenant de feuilles mûres et jeunes montrent un grand nombre de cellules vacuolisées.

2. La formation de bourgeons adventifs:

Dans la présente étude, les cals jaunes verdâtres nodulaires et compacts obtenus à partir des explants précités sont cultivés sur le milieu LS pour la régénération. Après 2 à 3 semaines, de légères protubérances apparaissent sur la surface des cals hypocotyles (Fig. 1), quand ils sont sous cultivés sur le milieu contenant de faibles niveaux de NAA (0.5 mg/l) et un niveau élevé de BAP (0.75 mg/l ; Tableau II). A la fin de la sixième semaine, les protubérances grandissent dans les plantules (Fig. 2). Parmi les différents types de cals étudiés, la formation de pousses adventives a lieu seulement à partir de cals hypocotyles. Lakshmi Sita et coll. (1979) et Oka et coll. (1982) ont aussi observé dans des espèces d'*Eucalyptus* que l'hypocotyle est plus approprié à la régénération de plantules. Cela peut être dû à la nature juvénile de la source d'explants.

Des études histologiques indiquent que la formation primordiale des bourgeons de pousses provient de la couche épidermique (Fig. 3). A l'origine, des cellules méristématiques apparaissent le long des couches épidermiques et l'activité mitotique est localisée dans des couches épidermiques et sous épidermiques. Des résultats similaires sont aussi observés chez le mûrier par Jain et Datta (1992). Ensuite, les zones méristématiques développées en bourgeons forment des bourgeons de pousses adventives dans une période de 4 à 6 semaines (Fig. 4).

3. L'induction des racines et la transplantation:

Les petites pousses bien développées (6-8 cm) sont transférées sur le milieu contenant IBA (0.75mg/l) pour l'induction des racines. Notre précédente observation montre aussi que la faible concentration d'IBA est suffisante pour l'induction de la racine (Kathiravan et coll. 1995). 87 % de racinement sont enregistrés dans un délai de 15 à 20 jours. Les plantules racinées sont transférées dans le sol et dans la vermiculite (1 : 1) (Fig. 5). Après la quatrième semaine, 92 % ont survécu. Les plantules se sont renforcées et elles ont été transplantées avec succès dans le champ. L'étude ci-dessus démontre ainsi un protocole reproductible pour la régénération des plantes à partir de cals dérivés d'hypocotyles. Les résultats de cette étude ouvrent une voie pour les études de manipulations génétiques chez le mûrier.

STUDIES ON MULTIBIVOLTINE COCOON COOKING: PART I. EFFECT OF STIFLING, TEMPERATURE AND DURATION OF COOKING ON WATER PENETRATION IN MULTIBIVOLTINE COCOONS

G. HARIRAJ, T. H. SOMASHEKAR & B. N. LAKSHMIPATHIAIAH

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board. B. T. M. Layout, Madiwala,
Bangalore - 560 068, India.

The method of stifling the cocoons influences the hardening of sericin and hence affects the water penetration during the process of cooking. Indian multibivoltine cocoons were studied for the effect of stifling methods, temperature and duration of single pan cooking on water absorption in cocoon and shell. The type of stifling and temperature of single pan cooking was found to have significant effect on water penetration in cocoon and shell. The water absorption in hot air drying methods was almost twice that of steam stifled which may be attributed to uniform hardening of sericin during the process of hot air drying. The water penetration in cocoon and shell was found to increase as the temperature in single pan cooking was increased. The duration of cooking selected in the study does not show significant difference in water absorption in cocoon and moisture content in shell.

Keywords: Multibivoltine cocoons, single pan cooking, hot air drying, steam stifling, water absorption.

INTRODUCTION

The amount of water penetration in cocoon depends on the structure of shell, process of stifling, method of cooking, temperature and duration of cooking. The studies on pre-treatment by cocoon cooking with respect to the moisture content was carried out in Japan (Shimazaki *et al.*, 1961, 1962 and Kinoshita *et al.*) for bivoltine cocoons. The multivoltine cocoons produced in India are of loose shell structure and more flossy in nature. These cocoons are presently stifled in steam for 10-15 minutes, to kill the pupa inside the cocoon conditioned for 2-3 days and the cocoons are cooked in single pan to grope the ends for reeling. The quality of raw silk thus produced is inferior in some of the characteristics. (T. N. Sonwalkar *et al.*, 1991). Hence hot air drying method is being advocated for uniform hardening of sericin and to improve the quality of silk. Results on the effect of time and temperature on water absorption for bivoltine cocoons have been reported. (Hariraj, *et al.* 1994). However, water penetration in hot air dried multibivoltine require optimisation of temperature and duration in single pan method of cooking. Hence studies have been carried out to observe the water penetration in cocoon and shell depending on the method of stifling, temperature and duration of single pan cooking.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials:

Multi × Bivoltine cocoons of PM × NB4D2 race reared in Karnataka state in India during the month of July 1994 has been used for the study.

Design of experiment:

The experiment was designed with three factors namely type of stifling (3 levels), temperature of cooking (4 levels), and duration of cooking (2 levels) using three way classification method.

Type of stifling

One lot of Multi × Bivoltine cocoons was divided into three equal parts. One part was steam stifled in a steam stifling chamber for a period of 15 minutes using saturated steam.

The second part of cocoons was hot air dried in batch type of hot air drier, following a temperature profile of 100° C - 60° C in 5 hours duration. Temperature was reduced in steps of 10° C every hour.

The third part of cocoons was stifled in a conveyor type hot air dried (3 band type) following the temperature profile of 100° C - 90° C - 60° C for a period of 5 hours. The cocoons were dried to optimum level in both types of hot air drying methods. The optimum degree of drying was achieved on the basis of shell ratio as follows:

$$\text{Degree of drying} = \frac{100 - \text{shell ratio (\%)}}{4} \div \text{Shell ratio (\%)}$$

Type of cooking:

The open pan system of cooking was used for cooking multi × bivoltine cocoons. The temperature of water in cooking was maintained at 4 levels i.e. 80° C, 85° C, 90° C and 95° C. The duration of cooking was 2 minutes and 3 minutes.

Water used:

Water of 7 pH, 80 ppm hardness and 150 ppm M- alkalinity was used for the study.

Data collected:

Initially the cocoons were measured for dry cocoon weight. After treatment, the cooked cocoon weight and cooked shell weight were determined. From the data, the absorption of water in the cocoon and moisture content in the shell were calculated using the formula given below. The data were analysed statistically.

$$\text{Absorption of water in cocoon} = W2/W1$$

Where,

W2 = cooked cocoon weight

W1 = dry cocoon weight

$$\text{Moisture content in shell} = (W3 - W4/W4) * 100$$

Where,

W3 = cooked shell weight

W4 = dry shell weight

RESULTS AND DISCUSSIONS

The results of analysis of variance for the absorption of water in cocoon and moisture content in shell of multibivoltine cocoons are presented in Tables - I and II. The effect of type of stifling and

temperature of cooking on water absorption in the cocoon and moisture content in the shell are shown in Fig. 1, 2, 3, & 4.

1. Absorption of water in cocoon:

From Table I, it can be inferred that the type of stifling as well as temperature of cooking has significant effect on absorption of water in cocoon both at 1% significant level. In the multibivoltine cocoons, the contribution factor of the temperature of cooking on water penetrating inside the cocoon is 44.98% and the effect of type of stifling is 39.3%. From the cross correlation effect it could be observed that the interaction between type of stifling and temperature of cooking is having significant effect on absorption of water inside cocoons at 5% level and the contribution factor being 7.64%.

Table I. Analysis of variance results of absorption of cooking water in cocoon.

Tableau I. Résultats de l'analyse de variance de l'absorption d'eau dans le cocon.

Factor	Sum of square	Degree of freedom	Variance	F-Value	Contribution factor (%)
<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>		<i>Valeur F</i>	<i>Contribution (%)</i>
A Type of stifling <i>Type d'étouffage</i>	37.567	2	18.784	57.094**	39.3
B Temperature of cooking <i>Température de cuisson</i>	43.210	3	14.404	4.781**	44.98
C Duration of cooking <i>Durée de la cuisson</i>	0.921	1	0.921		
A × B	9.146	6	1.524	4.632*	7.64
A × C	0.082	2	0.041		
B × C	1.236	3	0.412		
Error / <i>Ecart</i>	3.948	12	0.329		
Total	93.872	23			

It is observed from Figure 1 that the water penetration inside the cocoon is about 2.45 times in case of steam stifled cocoons where as it is almost twice that of steam stifled cocoons i.e. 4.98 and 5.21 times in case of hot air cocoons dried in batch and conveyor type respectively. The reasons attributed to this effect is the uniform hardening of sericin throughout the cocoon layer that is possible in hot air drying process resulting in uniform cooking and increased water penetration inside the cocoons. The conveyor dried cocoons showed a 6% increase in water absorption inside the cocoon over batch type hot air dried cocoons.

Table II. Analysis of variance results of moisture content in shell.

Tableau II. Résultats de l'analyse de variance de la teneur en humidité dans la coque.

Factor	Sum of square	Degree of freedom	Variance	F-Value	Contribution factor (%)
<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>		<i>Valeur F</i>	<i>Facteur de contribution (%)</i>
A Type of stifling <i>Type d'étouffage</i>	45359.3	2	22679.6	10.951**	10.94
B Temperature of cooking <i>Température de cuisson</i>	232707.0	3	77569.1	37.456**	60.15
C Duration of cooking <i>Durée de la cuisson</i>	414.25	1	414.25		
A × B	69686.8	6	11614.5	5.608**	15.19
A × C	3646.75	2	1823.37		
B × C	21204.5	3	7068.17		
Error / <i>Erreur</i>	24851.25	12	2070.93		
Total	376765.00	23			

Figure 3 shows the effect of cooking temperature on absorption of water in cocoon. It is seen that there is an increasing trend in absorption of water inside the cocoons with increasing temperature of cooking. Absorption of water into the cocoons increased from 2.91 to 6.24 times as the temperature in cooking increased from 80° C to 95° C. Thus it could be inferred that the 95° C temperature facilitates absorption of more water into the cocoons.

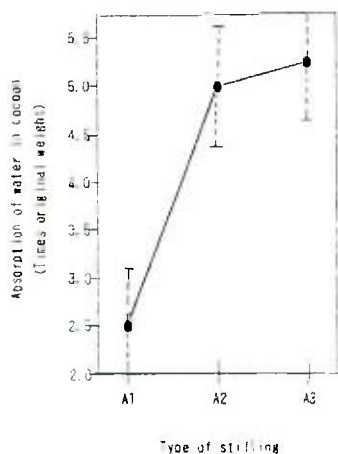


Fig 1. Effect of stifling on absorption of water in cocoon.

A1: Steam stifling

A2: Hot air drying (Batch type)

A3: Hot air drying (Conveyor type)

Fig 1. Effet de l'étouffage sur l'absorption d'eau dans le cocon.

A1: Etouffage à la vapeur.

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac)

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur).

2. Moisture content in shell:

From Table II it is seen that the type of stifling and temperature of cooking has a significant effect on moisture absorbed in cocoon shell at 5% significant level. However, the contribution factor of temperature of cooking on moisture content in shell is as high as 60.15% whereas the type of stifling has only 10.94%. From the cross correlation effect it could be seen that the interaction between type of stifling and temperature of cooking is significant at 5% level and having a contribution of 15.19% on moisture absorbed in the shell.

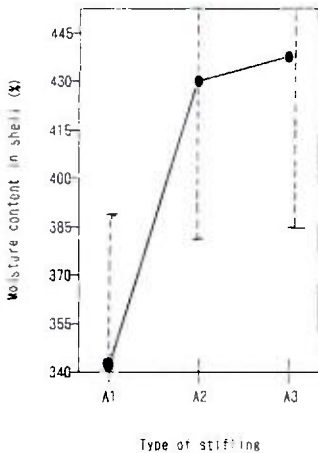


Fig 2. Effect of stifling on moisture content in shell.

A1: Steam stifling.

A2: Hot air drying (Batch type).

A3: Hot air drying (Conveyor type).

Fig 2. Effet de l'étouffage sur la teneur en humidité dans la coque.

A1: Etouffage à la vapeur.

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac).

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur).

The moisture content in the shell also increased by 26.5% in case of hot air dried cocoons compared to steam stifled cocoons, presumably due to the uniform hardening of sericin as seen from figure 2. However, no significant difference was observed in the moisture absorbed in cocoon shell between hot air dried cocoons using conveyor and batch type dryers.

Figure 4 indicates an increasing trend in the moisture content in shell from 295% to 537.8% as the temperature of cooking is increased. A similar trend was observed in the case of bivoltine cocoons as reported by G. Hariraj *et al.*, 1994. However, the moisture absorbed in the case of multibivoltine cocoons is twice that of bivoltine cocoons which may be attributed to the loose shell structure of multibivoltine cocoons.

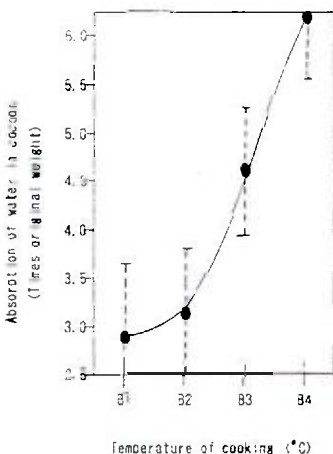


Fig 3. Effect of cooking temperature on absorption of water in cocoon.

Fig 3. Effet de la température de cuisson sur l'absorption d'eau dans le cocon.

B1: 80° C

B2: 85° C

B3: 90° C

B4: 95° C

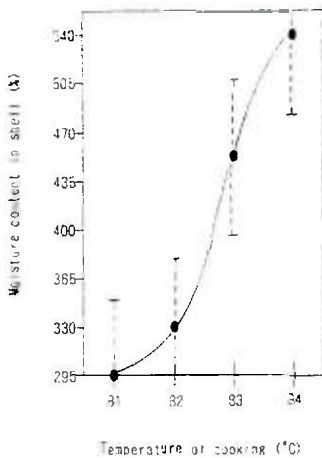


Fig 4. Effect of cooking temperature on moisture content in shell.

Fig 4. Effet de la température de cuisson sur la teneur en humidité dans la coque.

B1: 80°C.

B2: 85°C.

B3: 90°C.

B4: 95°C.

Steam stifling process only kills the pupa inside the cocoons and does not assist quality reeling. Whereas hot air drying hardens the sericin uniformly and facilitates increased absorption of water into the cocoon shell.

CONCLUSIONS

Water absorption in the cocoon and moisture absorbed in the shell is higher in the case of hot air dried cocoons compared to the steam stifled cocoons, presumably due to the drying and hardening of sericin on the surface of the filament in the successive layers of the shell. Further, higher temperature in single pan cooking significantly increases the water absorption in cocoon and moisture content in the shell.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the technical staff of Reeling section of C.S.T.R.I. for their assistance.

REFERENCES

- HARIRAJ G., KINOSHITA H. (1994) Studies on bivoltine cocoon cooking : Effect of time and temperature of retting on absorption and moisture content in Indian and Japanese cocoons, *Sericologia*, 34(3), 497-506.
- SHIMAZAKI A., SEKIZIMA M. (1961) Studies on pre-treatment of cocoon cooking Part I. *J. Silk Sci. Tech. Japan*, 11, 1-8.
- SHIMAZAKI A., YAMAMOTO A. (1962) Studies on pre-treatment of cocoon cooking. Part II. *J. Silk Sci. Tech. Japan*, 12, 4-7.
- KINOSHITA H., SUGANUMA Y., WATASE H. (1982) Effectiveness of pre-treatment on steam cooking with respect to moisture content. Part I. *Bull. Nagano Pref. Text. Res. Inst.* 10, 32-35.
- KINOSHITA H., SUGANUMA M., WATASE H. (1982) Effectiveness of pre-treatment of steam cooking with respect to moisture content. Part II. *J. Silk Sci. Tech. Japan*, 32, 10-12.
- SONAWALKAR T. N., ROY S., VASUMATHI B. V. (1992) Studies on commercial qualities of multivoltine hybrid raw silk reeled on various devices in Karnataka. *Indian J. Seric.* 31, No. 1, 9-16.

ETUDES SUR LA CUISSON DU COCON POLY×BIVOLTIN PREMIERE PARTIE : EFFET DE L'ETOUFFAGE, DE LA TEMPERATURE ET DE LA DUREE DE LA CUISSON SUR LA PENETRATION D'EAU DANS LES COCONS POLY×BIVOLTINS.

G. HARIRAJ, T. H. SOMASHEKAR & B. N. LAKSHMIPATHIAIAH

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, B. T. M. Layout, Madiwala,
Bangalore - 560 068, Inde.

La méthode d'étouffage des cocons influence le durcissement de la séricine et ainsi affecte la pénétration de l'eau pendant l'opération de cuisson. Les cocons indiens poly×bivoltins ont été étudiés par rapport à l'effet des méthodes d'étouffage, de la température et de la durée de cuisson dans un récipient unique sur l'absorption d'eau dans le cocon et l'enveloppe. Il s'avère que le type d'étouffage et la température de cuisson en récipient unique ont un effet significatif sur la pénétration d'eau dans le cocon. L'absorption d'eau après le séchage à l'air chaud est presque deux fois supérieure à celle obtenue après l'étouffage à la vapeur ce que l'on peut attribuer au durcissement uniforme de la séricine pendant le procédé de séchage à l'air chaud. On observe que la pénétration de l'eau dans le cocon et l'enveloppe augmente quand on augmente la température unique de cuisson. La durée de cuisson choisie pour l'étude ne donne pas de différence significative en ce qui concerne l'absorption d'eau dans le cocon et la teneur en humidité dans l'enveloppe.

INTRODUCTION

La pénétration d'eau dans le cocon dépend de la structure de l'enveloppe, du procédé d'étouffage, de la méthode de cuisson, de la température et de la durée de cuisson. Des études sur la cuisson du cocon en fonction de la teneur en humidité ont été entreprises au Japon (Shimazaki et coll., 1961, 1962 et Kinoshita et coll., 1982) pour les cocons bivoltins. Les cocons polyvoltins produits en Inde ont une structure d'enveloppe lâche de nature duveteuse. Ces cocons sont actuellement étouffés à la vapeur pendant 10-15 minutes, pour tuer les larves à l'intérieur du cocon, conditionnés pendant 2-3 jours et les cocons sont ensuite cuits dans un récipient unique pour purger les bouts pour le dévidage. La qualité de la soie grège ainsi obtenue est inférieure dans certaines de ses caractéristiques (T. N. Sonwalkar et coll., 1991). Ainsi on recommande la méthode de séchage à l'air chaud pour un durcissement uniforme de la séricine et pour améliorer la qualité de la soie. Les résultats de l'effet de la durée et de la température sur l'absorption d'eau pour les cocons bivoltins ont été décrits (Hariraj, et coll., 1994). Cependant, la pénétration d'eau dans les cocons polybivoltins demande l'optimisation de la température et de la durée de cuisson à récipient unique. Aussi des études ont été entreprises pour observer la pénétration d'eau dans le cocon et la coque en fonction de la méthode d'étouffage, de la température et de la durée de la cuisson en récipient unique.

MATERIELS ET METHODES

Matières premières :

Des cocons poly × bivoltins de la variété PM × NB4D2 élevés dans l'état de Karnataka en Inde pendant le mois de Juillet 1994 ont été utilisés pour l'étude.

Méthode d'expérimentation :

L'expérience a été conçue avec trois facteurs en l'occurrence le type d'étouffage (3 niveaux), la température de cuisson (quatre niveaux) et la durée de cuisson (deux niveaux) en utilisant une méthode de classification à trois voies.

Type d'étouffage :

Un lot de cocons poly × bivoltins a été divisé en trois parts égales. Une partie a été étouffée dans une chambre à vapeur pendant une période de 15 minutes en atmosphère de vapeur saturée.

La deuxième partie des cocons a été séchée à l'air chaud dans un séchoir pour traitement en vrac en suivant un diagramme de température de 100° C à 60° C en 5 heures. La température a été réduite par paliers de 10° chaque heure.

La troisième partie des cocons a été étouffée dans un séchoir à convoyeur (à trois bandes) en suivant un profil de température de 100° C - 90° C - 60° C pour une période de 5 heures. Les cocons sont séchés au niveau optimum pour les deux types de méthodes de séchage à l'air chaud. Le degré optimum de séchage a été atteint sur la base de la richesse soyeuse suivant :

$$\text{Degré de séchage} = \frac{100 - \text{richesse soyeuse (\%)}}{4} \div \text{Richesse soyeuse (\%)}$$

Type de cuisson :

Le système de cuisson à récipient unique a été utilisé pour la cuisson des cocons poly × bivoltins. La température de l'eau pendant la cuisson est maintenue à 4 niveaux, 80° C, 85° C, 90° C et 95° C. La durée de cuisson est de 2 minutes et de 3 minutes.

Eau utilisée :

De l'eau de pH 7, de dureté 80 ppm et d'alcalinité 150 ppm M est utilisée pour l'étude.

Données recueillies :

Le poids des cocons secs a été mesuré au départ. Après le traitement, le poids du cocon cuit et le poids de l'enveloppe cuite ont été déterminés. D'après les données, l'absorption d'eau dans le cocon et le taux d'humidité dans l'enveloppe sont calculés en utilisant la formule ci-dessous. Les données sont analysées de manière statistique.

$$\text{Absorption d'eau dans le cocon} = W2/W1$$

où,

W2 = poids du cocon cuit

W1 = poids du cocon sec

$$\text{Taux d'humidité dans l'enveloppe} = (W3-W4:W4)*100$$

Où

W3 = poids de la coque cuite

W4 = poids de la coque sèche

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'analyse de variance pour l'absorption d'eau dans le cocon et le taux d'humidité dans l'enveloppe des cocons poly×bivoltins sont présentés dans les tableaux I, II et III. L'effet du type d'étouffage et de la température de cuisson sur l'absorption d'eau dans le cocon et la teneur en humidité dans l'enveloppe sont présentés dans les Fig. 1, 2, 3.

I. Absorption d'eau dans le cocon :

Le tableau I permet de déduire que le type d'étouffage tout comme la température de cuisson ont des effets significatifs sur l'absorption d'eau dans le cocon tous les deux à un niveau de signification de 1 %. Pour les cocons poly×bivoltins, le facteur de contribution de la température de cuisson sur la pénétration d'eau à l'intérieur du cocon est de 44,98 % et l'effet du type d'étouffage est de 39,3%. On peut observer à partir de l'effet de corrélation croisée que l'interaction entre le type d'étouffage et la température de cuisson est significative sur l'absorption d'eau à l'intérieur des cocons à un niveau de 5 % et le facteur de contribution est de 7,64 %.

On observe d'après la figure 1 que la pénétration d'eau à l'intérieur du cocon est environ 2,45 fois plus forte dans le cas de cocons étouffés à la vapeur tandis qu'elle est deux fois celle des cocons étouffés à la vapeur, c'est à dire de 4,98 et de 5,21 dans le cas des cocons séchés à l'air chaud en vrac et avec convoyeurs respectivement. Les raisons de cet effet sont le durcissement uniforme de la sérécine sur toute l'étendue de la couche de sérécine qui est possible dans le procédé de séchage à l'air chaud entraînant une cuisson uniforme et une augmentation de la pénétration d'eau dans les cocons. Les cocons séchés avec des convoyeurs présentent une augmentation de 6 % de l'absorption d'eau par rapport aux cocons séchés en vrac à l'air chaud.

La figure 3 présente l'effet de la température de cuisson sur l'absorption d'eau dans le cocon. On observe qu'il y a une tendance à l'augmentation de l'absorption d'eau dans les cocons quand la température de cuisson augmente. L'absorption d'eau augmente de 2,91 à 6,24 fois alors que la température de cuisson passe de 80° C à 95° C. On peut ainsi en déduire que la température de 95° C facilite une plus grande absorption dans les cocons.

II. Teneur en humidité de la coque :

On observe d'après le tableau II que le type d'étouffage et la température de cuisson ont un effet significatif sur l'humidité absorbée dans l'enveloppe du cocon à un niveau de signification de 5 %. Cependant, le facteur de contribution de la température de cuisson sur la teneur en humidité dans l'enveloppe est de 60,15 % tandis que le type d'étouffage est seulement de 10,94 %. D'après l'effet de corrélation croisée, on peut observer que l'interaction entre le type d'étouffage et la température de cuisson est significatif à un niveau de 5 % et a une contribution de 15,19 % sur l'humidité absorbée dans l'enveloppe.

La teneur en humidité de la coque augmente de 26,5 % dans le cas des cocons séchés à l'air chaud par rapport aux cocons étouffés à la vapeur, ceci étant sûrement dû au durcissement uniforme de la sérécine comme on peut l'observer dans la figure 2. Cependant, on n'observe pas de différence significative pour l'humidité absorbée par la coque entre les cocons séchés à l'air chaud en vrac ou avec convoyeurs.

La figure 4 indique une tendance à la hausse dans le taux d'humidité de la coque de 295 % à 537,8 % quand on augmente la température de cuisson. On observe une tendance similaire dans le cas des cocons bivoltins comme l'ont reporté G. Hariraj et coll., 1994. Cependant l'humidité absorbée dans le cas des cocons poly×bivoltins est deux fois celle des cocons bivoltins, ce qui peut être attribué à la structure lâche de la coque des cocons poly×bivoltins.

Le procédé d'étouffage à la vapeur tue seulement les chrysalides à l'intérieur des cocons et ne facilite pas le dévidage de qualité. Tandis que le séchage à l'air chaud durcit la sérécine de manière uniforme et facilite l'augmentation de l'absorption d'eau à l'intérieur de la coque soyeuse.

CONCLUSIONS

L'absorption d'eau dans le cocon et l'humidité dans la coque sont plus élevées dans le cas des cocons séchés à l'air chaud comparée à celles des cocons étouffés à la vapeur, cela venant sûrement du séchage et au durcissement de la sérécine sur la surface du filament dans les couches successives de la coque. De plus, une température plus élevée dans la cuisson en récipient unique augmente l'absorption d'eau de manière significative dans le cocon et le taux d'humidité dans la coque.

STUDIES ON MULTIBIVOLTINE COCOON COOKING PART II : EFFECT OF STIFLING, TEMPERATURE AND DURATION OF COOKING ON REELING AND QUALITY CHARACTERISTICS.

G. HARIRAJ, T.H. SOMASHEKAR & B.N. LAKSHMIPATHIAIAH.

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, B.T.M. Layout, Madiwala,
Bangalore - 560 068, India.

Influence of stifling methods i.e. steam, Hot air (batch & conveyor) type on temperature and duration of open pan cooking with respect to reeling and quality characteristics has been studied. The type of stifling was found to have significant influence on groping end efficiency, non-broken filament length, reelability %, raw silk %, waste %, on silk weight, neatness and cleanness of raw silk, whereas the temperature and duration of open pan cooking has significant effect on non-broken filament length, reelability %, pelade weight and neatness of raw silk. The results indicate that the hot air dried cocoons both batch and conveyor dried, improves the reeling and quality characteristics, due to uniform hardening of the sericin during the processing. Conveyor type hot air dried cocoons performs better in reeling, than both steam & batch type hot air dried cocoons.

Keywords: multibivoltine cocoons, open pan cooking, hot air drying, steam stifling, non broken filament length, reelability.

INTRODUCTION

A series of studies have been conducted on systematization of cocoon cooking in relation to reeling characteristics for bivoltine cocoons. (Shimazaki *et al.*, 1977, Kinoshita *et al.*, 1979, 1980). In India presently multibivoltine cocoons are reared in large quantities. These cocoons are stifled by steam for 10-15 minutes to kill the pupa inside the cocoons, conditioned for 2-3 days and the cocoons are cooked in open pan system of cooking in ovens, around 85°-95°C for about 2 - 3 minutes. Introduction of hot air method of drying is being popularised using batch type hot air driers. (Sonwalker, 1992). However cooking the hot air dried cocoons in ovens requires standardisation of suitable temperatures and duration of cooking depending on the type of drying. Hence the study has been conducted for multivoltine cocoons varying the type of stifling, temperature of cooking and duration of cooking and the reeling performance i.e., groping end efficiency, non-broken filament length, reelability, Raw silk %, waste %, pelade weight and quality characteristics namely neatness, cleanness, tenacity and elongation have been studied.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials:

Multi x Bivoltine cocoons of PM X NB4D2 race reared in the month of July 1994 at Karnataka state of India has been used for the study.

Design of experiment:

The experiment was designed with three factors i.e., type of stifling (3 levels), temperature of cooking (4 levels) and duration of cooking (2 levels) using three way classification method.

Type of stifling:

One lot of Multi x Bivoltine cocoons was divided into three equal parts. One part was stifled in steam stifling chamber for a period of 15 minutes using saturated steam.

Second part of cocoons was hot air dried in batch type of hot air drier, following a temperature profile of 100°C - 60°C in 5 hours duration. Temperature was reduced in steps of 10°C every hour.

Third part of cocoons was stifled in conveyor type hot air drier (3 band type) following the temperature profile of 100°C - 90°C - 60°C for a period of 5 hours. The cocoons were dried to optimum level in both types of hot air drying methods. The optimum degree of drying was achieved on the basis of shell ratio as follows:

$$\text{Optimum degree of drying} = \frac{100 - \text{Shell ratio (\%)}}{4} \div \text{Shell ratio (\%)}$$

Type of cooking:

Open pan system of cooking was used for cooking multi x bivoltine cocoons. The temperature of water in cooking was maintained at 4 levels i.e. 80° C, 85 ° C, 90° C and 95° C temperature. The duration of cooking was 2 minutes and 3 minutes. The cooked cocoons were mechanically brushed in reeling basin at 85° C and end-picked at 45° C.

Reeling conditions:

The cocoons were reeled on 3 ends of a multiend reeling machine maintaining fixed number of cocoons to a reeling end. The temperature of reeling bath was maintained constant at 45° C and reeling speed at 120 m/min.

Water used:

Water having 7 PH, 80 ppm hardness and 150 ppm M- alkalinity was used for the study.

Data collected:

The reelability data i.e., groping end efficiency, average filament length, non-broken filament length, single cocoon filament denier, reelability %, Raw silk %, waste % on silk weight and pelade weight have been observed while reeling different combinations of treatments. The raw silk reeled was also subjected to the following quality test characteristics i.e., neatness %, cleanness %, tenacity and elongation %.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The analysis of variance results of groping end efficiency, Non-broken filament length, Reelability %, Raw silk %, Waste % on silk weight, neatness %, cleanness % and pelade weight are shown in table I. The effect of type of stifling on the above parameters are shown in figures 1 to 7. The effect of temperature of cooking on non-broken filament length, reelability and neatness of raw silk are shown in figures 8, 9 and 10. Further, the effect of duration of cooking on non-broken filament length, reelability and pelade weight are shown in figures 11, 12 and 13. The reeling characteristics i.e., average filament length, single cocoon filament denier do not have any significant difference on the treatments given in the study. The treatments did not show any significant effect on tenacity and elongation characteristics of raw silk.

Table I. Analysis of variance results of reeling and quality characteristics.**Tableau I. Analyse de variance des résultats de dévidage et des caractéristiques qualitatives.**

Characteristics		A	B	C	A*B	A*C	B*C
<i>Caractéristiques</i>							
Groping end efficiency	F-Value	3.297 Δ	1.600	-	0.856	-	-
<i>Rendement du purgeage</i>	C.F.	16.1	-	-	-	-	-
Non broken filament length	F-Value	15.860**	5.348**	19.82**	-	-	-
<i>Longueur du filament sans casse</i>	C.F.	35.1	15.5	22.3	-	-	-
Reelability (%)	F-Value	8.863**	8.654**	32.56**	-	-	-
<i>Dévidabilité (%)</i>	C.F.	16.9	24.6	33.8	-	-	-
Raw silk (%)	F-Value	126.49**	-	-	0.630	-	1.266
<i>Soie grège (%)</i>	C.F.	92.1	-	-	-	-	-
Waste (%) on silk weight	F-Value	6.127*	1.048	-	-	12.16**	1.386
<i>Perte (%) sur le poids de la soie</i>	C.F.	18.0	-	-	-	39.2	-
Pelade weight	F-Value	2.578	-	12.891**	2.063	-	2.234
<i>Poids de la pèlette</i>	C.F.	-	-	28.7	-	-	-
Neatness (%)	F-Value	4.083*	6.251**	-	-	-	4.331*
<i>Netteté (%)</i>	C.F.	11.2	28.7	-	-	-	18.2
Cleanness (%)	F-Value	4.280*	-	-	1.303	2.186	-
<i>Propreté (%)</i>	C.F.	19.4	-	-	-	-	-

A- Type of stifling / *Type d'étouffage*B- Temperature of cooking / *Température de cuisson*C- Duration of cooking / *Durée de cuisson*Upper numeral: F value / *Chiffre supérieur : Valeur F*

Δ 10 %, * 5 %, ** 1%.

Lower numeral: Contribution factor (%) / *Chiffre inférieur : Facteur de contribution (%)*.

1. Effect of type of stifling on reeling and quality characteristics:

(a) Groping end efficiency:

Table - I indicates that the type of stifling has significant effect on groping end efficiency at 10 % level and has a contribution factor of 16.1 %. Figure 1 shows the effect of type of stifling on groping end efficiency. It could be observed that the steam stifled cocoons have better groping end efficiency and the trend decreases for hot air dried cocoons using batch and conveyor type of stifling. The build of Multibivoltine cocoons is as such loose and steam stifling loosens the structure further. End groping from such surface is observed to be much easier, whereas hot air dried cocoons present a consolidated and shrunk surface from which end groping has been observed to be difficult.

(b) Non-broken filament length :

The non-broken filament length has significant effect on type of stifling at 1% level and has a contribution factor of 35.1 %. (Table I). Figure 2, shows that the steam stifled cocoons yield 9.7 % less non broken filament length compared to hot air dried cocoons. This is presumably due to hardening of sericin in the hot air drying process which results in uniform cooking leading to less end breakages in reeling. Conveyor type of hot air drying resulted in the maximum yield of non-broken filament length due to far more uniform drying achieved.

(c) Reelability:

It is observed that the type of stifling has significant effect on reelability at 1 % level (Table I), the contribution factor being 16.9 %. Figure 3 shows the effect of type of stifling on reelability of multi x bivoltine cocoons. It is observed that the conveyor type hot air dried cocoons resulted in better reelability compared to batch type hot air dried cocoons, whereas steam stifled cocoons resulted in low reelability compared to hot air dried cocoons. The hardening of sericin in the process of hot air drying results in uniform cooking degree and this appears to be the main factor for achieving better reelability.

d) Raw silk percentage:

Table I shows the significant effect of raw silk % on type of stifling at 1 % level with a high contribution factor of 92.1 %. Similar to reelability, raw silk % also showed better results for hot air dried cocoons compared to steam stifled cocoons as can be seen from figure - 4.

e) Waste % on silk weight:

Table I shows the significant effect of type of stifling on waste produced at 5 % level with a contribution factor of 18.0 %. Further from the cross correlation effect it could be observed that the interaction between the stifling and duration of cooking has significant effect at 1 % level and with a contribution factor of 39.2 %. The waste produced in steam stifled cocoons were higher than hot air dried cocoons due to low reelability % of steam stifled cocoons as seen from figure-5.

f) Neatness:

Table - I shows that the type of stifling has significant effect on neatness of raw silk at 5 % significant level and has a contribution of 11.2 %. From the figure - 6 it could be seen that there is a 4 % variation in neatness of raw silk reeled between steam stifled and hot air dried cocoons. However, the neatness percentage of raw silk reeled from batch type hot air dried cocoons and conveyor type hot air dried cocoons does not vary significantly.

g) Cleanness:

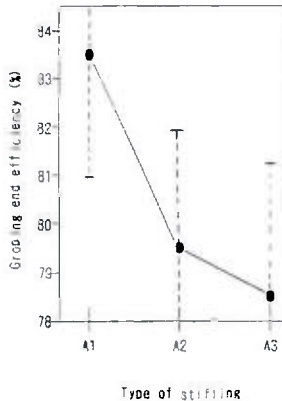


Fig. 1. Effect of stifling on groping end efficiency

A1: Steam stifling

A2: Hot air drying (Batch Type)

A3: Hot air drying (Conveyor Type)

Fig. 1. Effet de l'étouffage sur le purgeage et l'efficacité.

A1: Etouffage à la vapeur

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac)

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur)

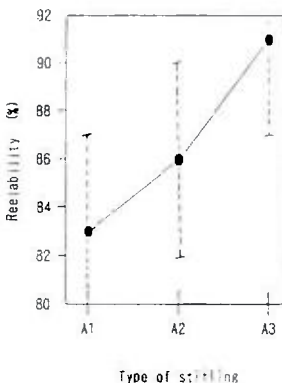


Fig. 3. Effect of stifling on reelability percentage

A1: Steam stifling

A2: Hot air drying (Batch type)

A3: Hot air drying (Conveyor Type)

Fig. 3. Effet d'étouffage sur le pourcentage de dévidabilité

A1: Etouffage à la vapeur

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac)

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur)

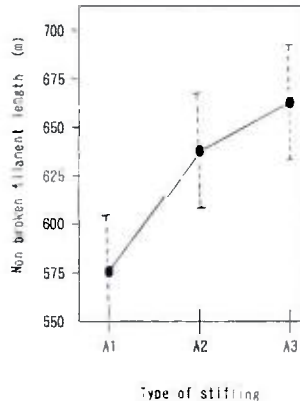


Fig. 2. Effect of stifling on non broken filament length

A1: Steam stifling

A2: Hot air drying (Batch type)

A3: Hot air drying (Conveyor Type)

Fig. 2. Effet d'étouffage sur la longueur du filament sans casse

A1: Etouffage à la vapeur

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac)

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur)

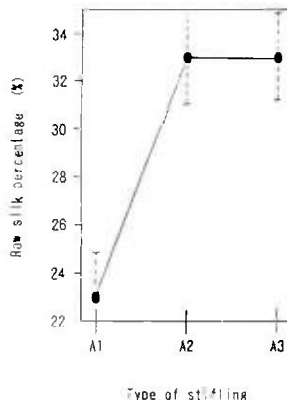


Fig. 4. Effect of stifling on raw silk percentage

A1: Steam stifling

A2: Hot air drying (Batch type)

A3: Hot air drying (Conveyor Type)

Fig. 4. Effet d'étouffage sur le pourcentage de soie grège

A1: Etouffage à la vapeur

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac)

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur)

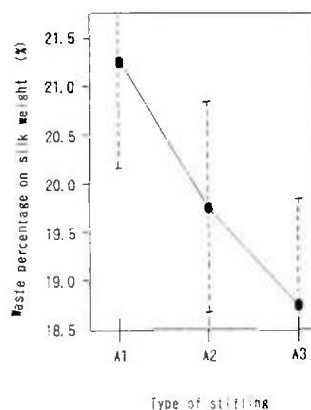


Fig. 5. Effect of stifling on waste percentage on silk weight

A1: Steam stifling

A2: Hot air drying (Batch type)

A3: Hot air drying (Conveyor Type)

Fig. 5. Effet d'étouffage sur le pourcentage de perte sur le poids de la soie

A1: Etouffage à la vapeur

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac)

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur)

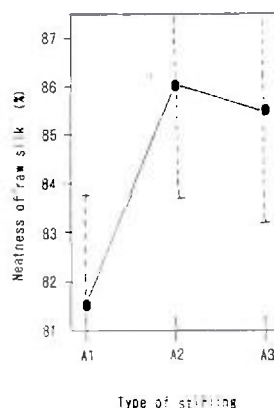


Fig. 6. Effect of stifling on neatness of raw silk

A1: Steam stifling

A2: Hot air drying (Batch type)

A3: Hot air drying (Conveyor Type)

Fig. 6. Effet d'étouffage sur la netteté de la soie grège

A1: Etouffage à la vapeur

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac)

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur)

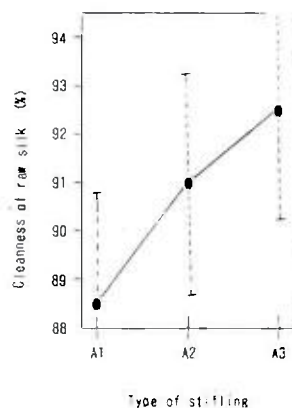


Fig. 7. Effect of stifling on cleanness of raw silk

A1: Steam stifling

A2: Hot air drying (Batch type)

A3: Hot air drying (Conveyor Type)

Fig. 7. Effet d'étouffage sur la propreté de la soie grège

A1: Etouffage à la vapeur

A2: Séchage à l'air chaud (en vrac)

A3: Séchage à l'air chaud (à convoyeur)

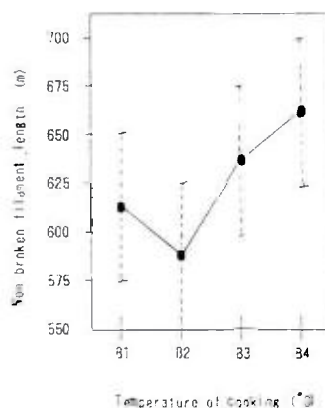


Fig. 8. Effect of cooking temperature on non broken filament length

Fig. 8. Effet de la température de cuisson sur la longueur du filament sans casse

B1: 80°C

B2: 85°C

B3: 90°C

B4: 95°C

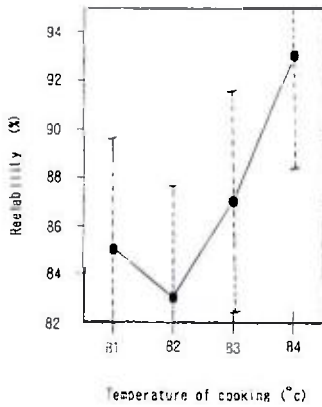


Fig. 9. Effect of cooking temperature on reelability percentage

Fig. 9. Effet de la température de cuisson sur le pourcentage de dévidabilité

B1: 80°C
B2: 85°C
B3: 90°C
B4: 95°C

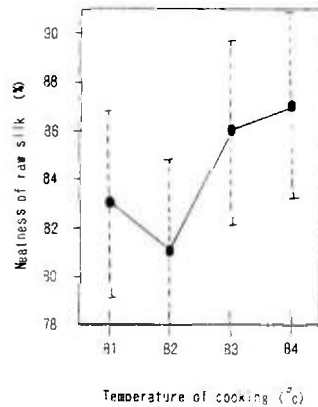


Fig. 10. Effect of cooking temperature on neatness of raw silk

Fig. 10. Effet de la température de cuisson sur la netteté de la soie grège

B1: 80°C
B2: 85°C
B3: 90°C
B4: 95°C

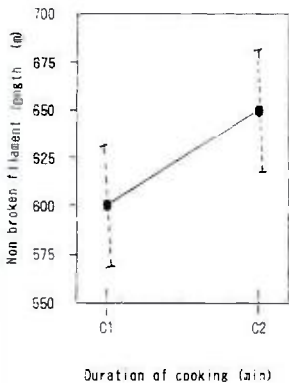


Fig. 11. Effect of duration of cooking on non broken filament length

Fig. 11. Effet de la durée de cuisson sur la longueur du filament sans casses

C1: 2 minutes
C2: 3 minutes

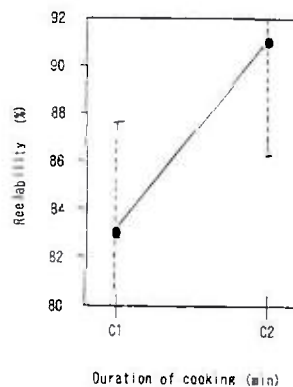


Fig. 12. Effect of duration of cooking on reelability percentage

Fig. 12. Effet de la durée de cuisson sur le pourcentage de dévidabilité

C1: 2 minutes
C2: 3 minutes

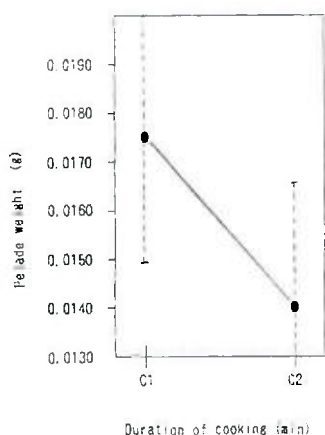


Fig. 13. Effect of duration of cooking on pelade weight produced

Fig. 13. Effet de la durée de cuisson sur le poids de la pélette produit

C1: 2 minutes

C2: 3 minutes

The type of stifling also has significant effect on the cleanness characteristics at 5 % significant level, having contribution factor of 19.4 %. (Table - 1). The Figure - 7 shows that there is a 2-3 % increase in cleanness of raw silk reeled between steam and hot air dried cocoons, which may be attributed to uniform penetration of water in cooking due to uniform hardening of sericin in hot air drying process.

2. Effect of temperature and duration of open pan cooking on reeling and quality characteristics:

a) Non-broken filament length:

Non-broken filament length is significantly influenced by both temperature of cooking and duration of cooking at 1 % level. The contribution factor being 15.5 % and 22.3 % for temperature of cooking and duration of cooking respectively. (Table I). It can be observed from figures - 8 & 11 that there is an overall increasing trend in non-broken filament length as the cooking temperature and duration of cooking increases. Thus indicating higher temperature of cooking and duration results in yielding better non-broken filament length in open pan cooking.

b) Reelability:

Reelability significantly varies as the temperature and duration of open pan cooking is varied at 1 % level in both cases (Table - I), the contribution factor being 24.6 % on temperature of cooking and 33.8 % on duration of cooking. As in the case of non-broken filament length, reelability also shows increasing trend for both temperature and duration of open pan cooking as can be seen from Figure - 9 and 12.

c) Neatness:

A significant relation exists between temperature in open pan cooking and neatness of raw silk reeled at 1 % significant level (Table - I), the contribution factor being 28.7 %. From the cross correlation effect it could be observed that the interaction between the cooking temperature and duration of cooking also has a significant effect at 5 % level with a contribution factor of 18.2 %. Figure - 10 shows that there is an increasing trend in neatness of raw silk reeled as the cooking temperature increased. However, the duration of cooking does not show significant difference in neatness of raw silk produced. Thus it may be inferred that though neatness is a racial character, the temperature of cooking also has a significant effect in improving this character in raw silk.

d) Pelade weight:

Pelade weight is significantly influenced by duration of cooking at 1 % level and has a contribution factor of 28.7 % (Table - I). Figure 13, shows that the pelade weight decreases as the cooking duration is increased, indicating that higher duration leads to better penetration of water up to inner most layers of the cocoon.

CONCLUSIONS

The study has clearly brought out that hot air dried cocoons yield better reelability and non-broken filament length compared to steam stifled cocoons due to uniform hardening of sericin in the process

of hot air drying. The higher temperature and duration of open pan cooking softens the sericin effectively and result in better reeling performance and quality of raw silk.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the technical staff of Reeling section of CSTRI, for their assistance in this work.

REFERENCES

- SHIMAZAKI A. (1961) Studies of statistical analysis method and control in silk reeling process. Bull. Seric. Exp. Sta., 16, 403-522.
- SHIMAZAKI A. (1977) Improvement of japanese raw silk production technology in view of reduction in cocoon production. J. Reeling Tech, 30,34-74.
- KINOSHITA H., SUGANUMA Y. (1979) Studies on the systematization of cocoon cooking I. On the analysis of the reeling characteristics by multivariate analysis. J. Seric. Sci. Jpn, 48, 404-410.
- KINOSHITA H., SUGANUMA Y., WATASE H. (1980) Studies on the systematization of cocoon cooking II. On the optimization of cocoon cooking by temperature patterns. J. Seric. Sci. Jpn, 49, 352-358.
- SONAWALKER T.N. (1992) Review of research work in post cocoon harvest technology in India. Sericologia, 32(1), 1-26.

ETUDES SUR LA CUISSON DES COCONS POLY X BIVOLTINS : PARTIE II. EFFET DE L'ETOUFFAGE, DE LA TEMPERATURE ET DE LA DUREE DE CUISSON SUR LES CARACTERISTIQUES DE DEVIDAGE ET DE QUALITE

G. HARIRAJ, T.H. SOMASHEKAR & B.N. LAKSHMIPATHIAIAH.

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board., B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore - 560 068, Inde.

Nous avons étudié l'influence des méthodes d'étouffage c'est-à-dire type vapeur, air chaud (en vrac & convoyeur) sur la température et la durée du cuisson en récipient ouvert en ce qui concerne les caractéristiques de dévidage et de qualité. On sait que le type d'étouffage a une influence significative sur le rendement du purgeage, la longueur du filament sans casses, le pourcentage de dévidabilité, de soie grège et de perte, sur le poids de la soie, sur la netteté et la propreté de la soie grège, alors que la température et la durée de cuisson en casserole ouverte a un effet significatif sur la longueur du filament sans casses, sur le pourcentage de dévidabilité, sur le poids de la pélette et sur la netteté de la soie grège. Les résultats indiquent que les cocons séchés à l'air chaud en vrac et par convoyeurs, ont des caractéristiques de dévidage et de qualité supérieures, cela est dû au durcissement uniforme de la sérécine durant le processus. Les cocons séchés à l'air chaud sur convoyeurs donnent un meilleur résultat de dévidage que les cocons séchés à l'air chaud en vrac ou séchés à la vapeur en vrac.

INTRODUCTION

Une série d'études a été menée sur la systématisation de la cuisson du cocon par rapport aux caractéristiques de dévidage pour les cocons bivoltins. (Shimazaki et coll., 1977, Kinoshita et coll., 1979, 1980). En Inde, les cocons poly x bivoltins sont élevés à grande échelle. Ces cocons sont étouffés à la vapeur pendant 10-15 minutes pour tuer la nymphe à l'intérieur des cocons, puis ils sont conditionnés pendant 2-3 jours et les cocons sont cuits dans un système de casserole ouverte dans des fours, à environ 85-95° C pendant environ 2-3 minutes. L'introduction de la méthode du séchage à l'air chaud est en train de se populariser utilisant des séchoirs à air chaud en vrac (Sonwalker, 1922). Cependant, cuire des cocons séchés à l'air chaud exige la standardisation de la température et de la durée de cuisson adaptée au type de séchage. Par conséquent, l'étude a été menée pour les cocons poly x voltins en variant le type d'étouffage, la température de cuisson, la durée de cuisson et le rendement du dévidage c'est-à-dire, le rendement du purgeage, la longueur du filament sans casses, la dévidabilité, le pourcentage de soie grège, le pourcentage de perte et le poids de la pélette. Les caractéristiques qualitatives à savoir la netteté, la propreté, la ténacité et l'allongement ont été étudiées.

MATERIELS ET METHODES

Matériels bruts :

Les cocons poly x bivoltins de la race PM X NB4D2 élevés au mois de juillet 1994 dans l'état de Karnataka en Inde ont été utilisés pour l'étude.

Conception de l'expérience :

L'expérience est conçue avec trois facteurs c'est-à-dire le type d'étouffage (3 niveaux), la température de cuisson (4 niveaux) et la durée de cuisson (2 niveaux) faisant appel à une méthode de classification à trois voies.

Type d'étouffage :

Un lot de cocons poly x bivoltins est divisé en trois parties égales. Une partie est étouffée dans une chambre d'étouffage à la vapeur pendant 15 minutes utilisant la vapeur saturée.

La deuxième partie des cocons est séchée à l'air chaud en vrac à l'aide d'un séchoir à air chaud, suivant une température de l'ordre de 100° C - 60° C pendant 5 heures. La température est réduite par étapes de 10° C chaque heure.

La troisième partie des cocons est étouffée dans un séchoir à air chaud à convoyeurs (type 3 bandes) suivant une température de l'ordre de 100° C - 90° C - 60° C pendant 5 heures. Les cocons sont séchés à un niveau optimal pour les deux types de méthodes de séchage à l'air chaud. Le degré optimal de séchage est atteint sur la base d'un rapport de coque comme suit :

$$\text{Degré optimal de séchage} = \frac{100 - \text{rapport de coque}}{4} + \text{rapport de coque (\%)}$$

Type de cuisson :

Le système de cuisson en casserole ouverte est utilisé pour cuire les cocons poly x bivoltins. La température de l'eau de cuisson est maintenue à 4 niveaux en l'occurrence 80° C, 85° C, 90° C et 95° C. La durée de cuisson est de 2 et 3 minutes. Les cocons cuits sont brossés mécaniquement dans une bassine de dévidage à 85° C et finalement le bout est récupéré à 45° C.

Conditions de dévidage :

Les cocons sont dévidés sur 3 bouts d'une machine de dévidage multi-bouts maintenant un nombre fixe de cocons sur un bout de dévidage. La température du bain de dévidage est maintenue constante à 45° C et à la vitesse de dévidage de 120m/mn.

L'eau utilisée :

L'eau utilisée a un PH de 7, une dureté de 80 ppm et une alcalinité de 150 M ppm.

Données recueillies :

Les données de dévidabilité en l'occurrence le rendement du purgeage, la longueur moyenne du filament, la longueur du filament sans casses, le denier du filament d'un cocon, le pourcentage de dévidabilité, le pourcentage de soie grège, le pourcentage de perte sur le poids de la soie et le poids de la pélette ont été mesurées lors des différentes combinaisons des traitements. La soie grège dévidée a été soumise aux tests de qualité suivantes : le pourcentage de netteté, le pourcentage de propreté, le pourcentage de ténacité et d'allongement.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'analyse de variance du rendement du purgeage, de la longueur du filament sans casses, du pourcentage de dévidabilité, du pourcentage de la soie grège, du pourcentage de perte du poids de la soie, du pourcentage de netteté, du pourcentage de propreté et du poids de la pélette est indiquée dans le tableau I. L'effet du type d'étouffage sur les paramètres ci-dessus est indiqué dans les graphiques 1 à 7. L'effet de la température de cuisson sur la longueur du filament sans casses, la dévidabilité et la netteté de la soie grège est indiqué dans les graphiques 8, 9 et 10. De plus, l'effet de la durée de cuisson sur la longueur du filament sans casses, la dévidabilité et le poids de la pélette est indiqué

dans les graphiques 11, 12 et 13. Les caractéristiques de dévidage en l'occurrence la longueur moyenne du filament, le denier du filament d'un cocon ne donnent pas de différence significative en fonction des traitements. Les traitements ne donnent pas d'effet significatif sur les caractéristiques de ténacité et d'allongement de la soie grège.

1. Effet du type d'étouffage sur les caractéristiques de dévidage et de qualité :

1.1. Rendement du purgeage :

Le tableau I indique que le type d'étouffage a un effet significatif sur le rendement du purgeage au seuil de 10 % et a un facteur de contribution de 16,1 %. Le graphique 1 indique l'effet du type d'étouffage sur le rendement du purgeage. On peut remarquer que les cocons étouffés à la vapeur donnent un meilleur rendement de purgeage et la tendance diminue pour les cocons séchés à l'air chaud faisant appel au type d'étouffage en vrac et par convoyeurs. La structure des cocons poly x bivoltins est lâche et l'étouffage à la vapeur détend davantage la structure. On sait que le purgeage d'une telle surface est beaucoup plus facile, alors que les cocons séchés à l'air chaud présentent une surface consolidée et rétrécie à partir de laquelle le purgeage est connu pour être difficile.

1.2. La longueur du filament sans casses :

La longueur du filament sans casses est significativement différente selon le type d'étouffage à un seuil de 1 % avec un facteur de contribution de 35,1 % (Tableau I). Le graphique 2 indique que les cocons étouffés à la vapeur produisent 9 % de longueur de filament sans casses de moins que les cocons séchés à l'air chaud. Cela est vraisemblablement dû à la dureté de la séricine dans le processus de séchage à l'air chaud qui résulte d'une cuisson uniforme conduisant à moins de bouts cassés dans le dévidage. Le type de séchage par convoyeurs à l'air chaud aboutit au rendement maximum de longueur de filament sans casses, cela est dû à un séchage beaucoup plus uniforme.

1.3. Dévidabilité :

On remarque que le type d'étouffage a un effet significatif sur la dévidabilité à un niveau de 1 % (tableau I), le facteur de contribution étant de 16,9 %. Le graphique 3 indique l'effet du type d'étouffage sur la dévidabilité des cocons poly x bivoltins. On remarque que les cocons séchés à l'air chaud sur convoyeurs conduisent à une meilleure dévidabilité que les cocons séchés à l'air chaud en vrac. La dureté de la séricine dans le processus du séchage à l'air chaud aboutit à un degré de cuisson uniforme et cela semble être le principal facteur pour atteindre une meilleure dévidabilité.

1.4. Pourcentage de soie grège :

Le tableau I montre l'effet significatif sur le pourcentage de soie grège du type d'étouffage à un seuil de 1 % avec un facteur de contribution élevé de 92,1 %. Semblable à la dévidabilité, le pourcentage de soie grège affiche aussi de meilleurs résultats pour les cocons séchés à l'air chaud que pour les cocons étouffés à la vapeur comme l'illustre la figure 4.

1.5. Pourcentage de perte sur le poids de la soie :

Le tableau I montre l'effet significatif de type d'étouffage sur la perte, à un niveau de 5 % avec un facteur de contribution de 18,0 %. En outre, à partir de l'effet de corrélation croisée, on peut remarquer que l'interaction entre l'étouffage et la durée de cuisson a un effet significatif à un seuil de 1 % et avec un facteur de contribution de 39,2 %. La perte produite pour les cocons étouffés à la vapeur est plus élevée que pour les cocons séchés à l'air chaud, cela est dû à un faible pourcentage de dévidabilité des cocons étouffés à la vapeur comme le montre la figure 5.

1.6. Netteté :

Le tableau I montre que le type d'étouffage a un effet significatif sur la netteté de la soie grège à un seuil de 5 % et a un facteur de contribution de 11,2 %. Sur la figure 6, on peut remarquer qu'il y a une variation de 4 % dans la netteté de la soie grège dévidée entre des cocons étouffés à la vapeur

et des cocons séchés à l'air chaud. Cependant, le pourcentage de netteté de la soie grège dévidée à partir des cocons séchés à l'air chaud en vrac et les cocons séchés à l'air chaud par convoyeurs ne varie pas de façon significative.

1.7. Propreté

Le type d'étouffage a aussi un effet significatif sur les caractéristiques de propreté à un seuil significatif de 5 %, avec un facteur de contribution de 19,4 % (Tableau I). La figure 7 indique qu'il y a une augmentation de 2-3 % dans la propreté de la soie grège dévidée entre les cocons à la vapeur et séchés à l'air chaud, qui peut être attribuée à une pénétration uniforme de l'eau lors de la cuisson provoquée par la dureté uniforme de la sérécine dans le processus de séchage à l'air chaud.

2. Effet de la température et de la durée de la cuisson en casserole ouverte sur les caractéristiques de dévidage et de qualité :

2.1. Longueur du filament sans casses :

La longueur du filament sans casses est considérablement influencée par la température de cuisson et la durée de cuisson à un seuil de 1 %. Le facteur de contribution étant respectivement de 15,5 % et 22,3 % pour la température de cuisson et la durée de cuisson (Tableau I). Les figures 8 et 11 montrent qu'il y a une tendance générale à la hausse dans la longueur du filament sans casses tandis que la température de cuisson et la durée de cuisson augmentent. Ainsi cette hausse de température de cuisson et de durée aboutissent à un meilleur rendement de la longueur du filament sans casses lors de la cuisson en casserole ouverte.

2.2. Dévidabilité :

La dévidabilité varie considérablement lorsque la température et la durée de la cuisson en casserole ouverte sont modifiées à un seuil de signification de 1 % dans les deux cas (Tableau I), le facteur de contribution étant de 24,6 % sur la température de cuisson et de 33,8 % sur le temps de cuisson. Comme dans le cas de la longueur du filament sans casses, la dévidabilité indique aussi une tendance à la hausse pour la température et la durée de cuisson en casserole ouverte comme le montrent les figures 9 et 12.

2.3. Propreté :

Une relation significative existe entre la température de cuisson en casserole ouverte et la netteté de la soie grège dévidée à un niveau significatif de 1 % (Tableau I), le facteur de contribution étant de 28,7 %. À partir de l'effet de corrélation croisée, on peut remarquer que l'interaction entre la température de cuisson et la durée de cuisson a aussi un effet significatif à un seuil de 5 % avec un facteur de contribution de 18,2 %. La figure 10 indique qu'il y a une tendance à la hausse dans la netteté de la soie grège dévidée alors que la température de cuisson augmente. Cependant, la durée de cuisson ne donne pas de différence significative sur la netteté de la soie grège produite. Ainsi on peut conclure que bien que la netteté soit un caractère génétique, la température de cuisson a aussi un effet significatif en développant ce caractère dans la soie grège.

2.4. Poids de la pélette :

Le poids de la pélette est considérablement influencé par la durée de cuisson à un seuil de signification de 1 % avec un facteur de contribution de 28,7 % (Tableau I). La figure 13 montre que le poids de la pélette décroît lorsque le temps de cuisson est augmenté : cela signifie qu'une durée plus élevée conduit à une meilleure pénétration de l'eau jusqu'aux couches les plus internes du cocon.

CONCLUSIONS

L'étude a clairement mis en évidence que les cocons séchés à l'air chaud produisent une meilleure dévidabilité et une meilleure longueur de filament sans casses par rapport aux cocons étouffés à la

vapeur provoquées par la dureté uniforme de la séricine dans le processus du séchage à l'air chaud. La température et la durée de cuisson en casserole ouverte plus élevées ramollissent réellement la séricine et aboutissent à un meilleur résultat de dévidage et une meilleure qualité de la soie grège.

ROLE OF MULBERRY, *MORUS ALBA* L., COUPLED WITH SULPHUR IN THE RECLAMATION OF SODIC SOIL.

P.C. BOSE¹ AND S.K. MAJUMDER¹

1. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore-742 101, West Bengal, India.*
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore- 570 008, India

*An experiment was conducted to study the role of mulberry, **Morus alba** L., coupled with sulphur in the reclamation of sodic soil. The experiment was comprised of mulberry, sulphur (2 Mt/ha and 4 Mt/ha) and the combination of mulberry and sulphur. Mulberry alone does not have any significant role in the reclamation of sodic soil, but, mulberry coupled with sulphur is more effective than the sulphur alone in the reclamation of sodic soil. Sulphur and mulberry coupled with sulphur reduced the soil pH and exchangeable sodium percentage considerably while electrical conductivity, on the other hand, increased. Mulberry coupled with sulphur (4 Mt/ha), however, was found to be the most effective in the reclamation of sodic soil.*

Keywords: Sodic soil, sulphur, mulberry, soil reaction, electrical conductivity, exchangeable sodium percentage.

INTRODUCTION

Around 7 million hectares of land is affected by salinity or alkalinity in India (Abrol and Bhumbra, 1971). Efforts have been made by various workers to reclaim sodic soils by applying different amendments with reference to various agricultural crops (Gaul and Dargan, 1978; Duraiswamy *et al.*, 1986; Venureddy *et al.*, 1973). As these soils are not suitable for the cultivation of mulberry as such, it should be reclaimed and made cultivable for mulberry (Ullal and Narasimhanna, 1981). Any attempt to reclaim these soils would mean the removal of exchangeable Na⁺ from clay complex and for this purpose various amendments of both organic and inorganic are being used (Bose *et al.*, 1992). However, no study has so far been carried out to know the role of mulberry alone and in combination with sulphur in the reclamation of sodic soil. Therefore, an attempt has been made in the present investigation to find out the role of mulberry alone as well as in combination with sulphur in the reclamation of sodic soil.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in a sodic soil area of the mulberry farm of Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. The soil of the experimental field was red loamy, with pH of 8.80, 8.80, 9.15 and 9.35, electrical conductivity (dsm⁻¹) was 0.161, 0.266, 0.458 and 0.589 and exchangeable sodium percentage (ESP) was 19.79, 21.50, 23.37 and 24.61 at surface, 30, 60 and 90 cms respectively. Mulberry (K₂) was grown as test crop in plots (6m × 6m) with a spacing of 0.9m ×

* Present address and address for correspondence.

Table 1. Effect of mulberry, sulphur and mulberry coupled with sulphur on soil reaction, electrical conductivity and exchangeable sodium percentage.

Tableau 1. Effet du mûrier, du soufre et du mûrier + soufre sur la réaction du sol, la conductivité électrique et le pourcentage de sodium échangeable.

Treatments	Soil reaction (pH)				Electrical conductivity (dsm ⁻¹)				Exchangeable sodium (ESP) (%)			
	Surface	30 cm	60 cm	90 cm	0 cm	30 cm	60 cm	90 cm	0 cm	30 cm	60 cm	90 cm
Traitements	Réaction du sol (pH)				Conductivité électrique (dsm ⁻¹)				Sodium échangeable (ESP) (%)			
	En surface	30cm	60cm	90cm	0 cm	30cm	60cm	90cm	0 cm	30cm	60cm	90cm
Control / Témoin	8.80	8.80	9.15	9.35	0.161	0.266	0.458	0.589	19.79	21.50	23.37	24.61
Mulberry / Mûrier	8.55	8.60	9.05	9.30	0.251	0.434	0.682	0.774	17.34	20.07	22.02	23.44
Sulphur (2 Mt/ha) Soufre (2 Mt/ha)	7.65	8.31	8.90	9.17	0.705	1.099	1.493	1.639	12.54	16.93	20.09	22.84
Sulphur (4 Mt/ha) Soufre (4 Mt/ha)	6.60	7.98	8.62	8.99	1.120	1.487	1.952	2.058	9.64	14.05	17.97	21.72
Mulberry + Sulphur (2 Mt/ha) Mûrier + Soufre (2 Mt/ha)	7.20	8.16	8.74	9.08	0.671	1.044	1.462	1.584	11.15	15.86	19.27	22.17
Mulberry + Sulphur (4 Mt/ha) Mûrier + Soufre (4 Mt/ha)	5.85	7.81	8.53	8.91	0.991	1.394	1.872	1.994	8.11	13.30	17.40	21.28
F	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
SE ±	0.095	0.091	0.068	0.055	0.008	0.018	0.018	0.028	0.077	0.068	0.079	0.129
CD at 5% / CD à 5%	0.298	0.285	0.214	0.171	0.024	0.056	0.056	0.087	0.241	0.214	0.247	0.405

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

0.9m. The experiment was laid in a randomised block design with three replications and applied flood irrigation (about 8 cm) at an interval of seven to ten days to all the six treatments (including control). Sulphur @ 2 and 4 Mt/ha was applied with and without mulberry. Soil samples were collected from various depths of the treated plots at regular intervals and were analysed for soil pH, EC and ESP.

RESULTS AND DISCUSSION

Different treatments caused a decrease in soil pH by 0.25 to 2.95, 0.20 to 0.99, 0.10 to 0.62 and 0.05 to 0.44 units (Table 1) and ESP values by 2.45 to 11.68; 1.43 to 8.20, 1.35 to 5.97 and 1.17 to 3.33 (Table 1) at the surface, 30, 60 and 90 cms depths respectively, the maximum decrease being with the treatment, mulberry + sulphur (4 Mt/ha) followed by sulphur (4 Mt/ha). On the other hand, the EC value for surface soil increased to the extent of 0.9 dsm^{-1} . However, the increase varied from 0.168 to 1.221 and 0.224 to 1.494 dsm^{-1} respectively at 30 and 60 cms depths, with more or less same trend at 90 cm depth, the maximum being with the treatment, sulphur (4 Mt/ha) followed by mulberry + sulphur (4 Mt/ha).

The maximum decrease in soil pH and ESP by the treatment, mulberry + sulphur (4 Mt/ha), may be attributed to the reason that the element sulphur added to the soil is subjected to microbial transformation into SO_4^{2-} before it is taken up by mulberry (Tandon *et al.*, 1995). It is conceivable from the study that microorganism (*Thiobacillus Sp.*), which might have a strong association with the rhizosphere of mulberry, transformed the elemental sulphur to sulphate in an amount adequate to decrease the pH and ESP significantly. This kind of transformation could also be available in the rhizosphere of different plant species (Arora *et al.*, 1991).

On the basis of the above findings, it can be concluded that the effect of the treatments under study was most prominent in surface soils, which gradually decreased with the increase in depth. Moreover, mulberry coupled with sulphur is more effective in the reclamation of sodic soil than the sulphur alone and mulberry as such does not have any significant role in the reclamation of sodic soil.

REFERENCES

- ABROL I.P., BHUMBLA D.R. (1971) Saline alkali soils in India- their occurrence and management. World Soil Regour (FAO, Rome, Italy), 41, 42-51.
- ARORA B.R., HUNDAL H.S., SEKHON G.S. (1991). Efficiency of different sulphur carriers to peanut, maize and wheat on an alkaline soil. Journal of Indian Society of Soil Science, 39(3), 591-592.
- BOSE P.C., MAJUMDER S.K., DUTTA R.K. (1992). Effect of amendments on chemical properties of alkali soil of mulberry garden and its yield. Indian J. Seric., 31 (2), 147-150.
- DURASAMY P., KOTHANDARAMAN G.V., CHELLAMUTHU S. (1986). Effect of amendments and zinc on chemical properties of an alkali soil. Madras Agric. J., 73 (3), 129-134.
- GAUL B.L., DARGAN K.S. (1978). Effect of doses and frequency of gypsum application in reclamation and crop production in sodic soil. Indian J. Agron., 23, 1-4.
- TANDON H.L.S., MESSICK D.L., CECOTTI S.P. (1995). Elemental sulphur-based and other available sulphur fertilizers in «Sulphur fertilizers for Indian Agriculture- A guidebook ». Edited by H.L.S. Tandon, Fertilizer Development and Consultation Organisation, New Delhi, p. 94, 96.
- ULLAL S.R., NARASIMHANNA M.N. (1981) Handbook of Practical Sericulture. Central Silk Board, p. 10.
- VENUREDDY R., KRISHNAMOORTHY K.K., RANDOSS C. (1973). Reclamation and utilization of salt affected soils. Madras Agric. J., 60, 854-858.

LE ROLE DU MURIER, *MORUS ALBA* L., COUPLE AU SOUFRE DANS LA REGENERATION DU SOL SODIQUE.

P.C. BOSE¹ S.K. MAJUMDER¹

1. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, Inde.*
1. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore - 570 008, Inde.

*Une expérience a été faite pour étudier le rôle du mûrier, **Morus alba** L., ajouté au soufre dans la régénération du sol sodique. L'expérience comprend le mûrier, le soufre (2 t/ha et 4 t/ha) et la combinaison de mûrier et de soufre. Le mûrier seul n'a pas de rôle significatif dans la régénération du sol sodique, mais, le mûrier ajouté au soufre est plus efficace que le soufre seul dans la régénération du sol sodique. Le soufre et le mûrier ajouté au soufre réduisent considérablement le pH du sol et le pourcentage de sodium échangeable alors que la conductivité électrique augmente. Cependant, le mûrier ajouté au soufre (4 t/ha) est plus efficace dans la régénération du sol sodique.*

INTRODUCTION

Environ 7 millions d'hectares de terre sont touchés par la salinité et l'alcalinité en Inde (Abrol et Bhumbla, 1971). Des efforts ont été faits par divers auteurs pour régénérer les sols sodiques en appliquant les différents amendements en référence aux diverses récoltes agricoles (Gaul et Dargan, 1978 ; Duwaiswamy et coll., 1986 ; Venureddy et coll., 1973). Comme ces sols ne conviennent pas à la culture du mûrier en tant que tels, ils devraient être assainis et rendus cultivables pour le mûrier (Ullal et Narasimhanna, 1981). Toute tentative pour régénérer ces sols signifie l'élimination du Na⁺ échangeable du complexe argileux, et dans ce but différents amendements organiques et inorganiques sont utilisés (Bose et coll., 1992). Cependant, aucune étude n'a été effectuée jusqu'ici pour connaître le rôle du mûrier seul et mélangé au soufre dans la régénération du sol sodique. Par conséquent, une tentative a été faite dans la présente étude dans le but de découvrir le rôle du mûrier seul ainsi que le rôle du mûrier mélangé avec le soufre dans la régénération du sol sodique.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été menée dans une zone de sol sodique de la ferme du Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. Le sol du terrain expérimental est riche en terreau rouge, avec un pH de 8,80, 8,80, 9,15 et 9,35 ; la conductivité électrique (dsm^{-1}) est de 0,161, 0,266, 0,458 et 0,589 ; le pourcentage de sodium échangeable (ESP) est de 19,79, 21,50, 23,37 et 24,61 à la surface, et à 30,60 et 90 cm respectivement. Le mûrier (K₂) a poussé comme une culture d'essai dans des parcelles de 6 m × 6 m avec un espacement de 0,9 m × 0,9 m. L'expérience a été menée selon un plan en blocs aléatoires avec trois répétitions et une irrigation fluviale (environ 8 cm) à un intervalle de sept à dix jours pour les six traitements (le témoin inclus). Le soufre à raison de 2 et 4 t/ha a été appliqué avec

* Adresse actuelle et adresse de correspondance.

ou sans mûrier. Des échantillons du sol ont été rassemblés à partir des différentes profondeurs des terrains traités à intervalles réguliers et ont été analysés pour le pH, EC et ESP.

RESULTATS ET DISCUSSION

Différents traitements ont provoqué une baisse du pH du sol de 0,25 à 2,95, de 0,20 à 0,99, de 0,10 à 0,62 et de 0,05 à 0,44 unités (Tableau I) et les valeurs ESP de 2,45 à 11,68 ; de 1,43 à 8,20, de 1,35 à 5,97 et de 1,17 à 3,33 (Tableau I) à la surface, à 30,60 et 90 cm de profondeur respectivement, la baisse maximum étant obtenue avec le traitement mûrier + soufre (4 t/ha) suivi par le soufre (4 t/ha). Par ailleurs, la valeur EC pour la surface du sol a augmenté jusqu'à $0,9 \text{ dsm}^{-1}$. Cependant, l'augmentation varie de 0,168 à 1,221 et de 0,224 à 1,494 dsm^{-1} respectivement à 30 et 60 cms de profondeurs, avec plus ou moins la même tendance à 90 cm de profondeur, le maximum étant avec le traitement soufre (4 t/ha) suivi par le mûrier + le soufre (4 t/ha).

La baisse maximum du pH et du ESP du sol par le traitement mûrier + soufre (4 t/ha), peut être attribuée au fait que l'élément soufre additionné au sol est sujet à une transformation microbienne en SO_4^{2-} avant qu'il soit absorbé par le mûrier (Tandon et coll., 1995). Si l'on considère l'étude, il est concevable que le micro-organisme (*Thiobacillus Sp.*), qui pourrait avoir une association étroite avec la rhizosphère du mûrier, a transformé le soufre élémentaire en sulfate en quantité suffisante pour diminuer significativement le pH et l'ESP. Ce genre de transformation pourrait aussi survenir dans la rhizosphère de différentes espèces de plantes (Arora et coll., 1991).

En référence aux résultats ci-dessus, il peut être conclu que selon l'étude, l'effet des traitements est plus frappant à la surface, et décroît petit à petit avec la profondeur. En outre, le mûrier ajouté au soufre est plus efficace dans la régénération du sol sodique que le soufre seul et le mûrier seul n'a pas de rôle significatif dans la régénération du sol sodique.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	773
General sericulture	
Mûrier	775
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	779
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	783
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	785
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	789
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	795
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	797
Silkworms: silkglands	
Soie	799
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portugais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</i> .	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the abstract.

Sériciculture générale

General sericulture

Silk industry of Assam : a perspective.

L'industrie de la soie du Assam : une perspective.

BAISHYA P.

Sualkuchi, Assam, India.

1998 Indian Silk, Vol. 36(9), 17-20, 23. (E)

Andrah Pradesh : women empowerment in sericulture.

Andrah Pradesh : les femmes ont les pleins pouvoirs en sériciculture.

BIDARI D., RAJASEKHAR REDDY M.

National Institute of Rural Development, Rajendranagar, Hyderabad, India.

1998 Indian Silk, Vol. 36(11), 15-17. (E)

Narration on the rise and decline of producing perny silk moth (*Antheraea pernyi*) in Zhejiang Province.

Historique de la croissance et du déclin de la production du papillon à soie perny (*Antheraea pernyi*) dans la province de Zhejiang.

CHEN Q.

Agricultural Department of Zhejiang Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(4), 13-15. (C,e)

Silk review 1997 : A survey on international trends in production and trade. Fifth edition.

Rapport sur la soie 1997 : une étude sur les tendances internationales de la production et du commerce. Cinquième édition.

COLLECTIF I.T.C. / C.C.I.

1997 International Trade Centre, Palais des Nations 1211, Geneva 10, Switzerland. 55 p. (E)

Notte fonda sulla bachicoltura Italiana.

Sombre perspective pour la sériciculture italienne.

DE BASTIANI D.

1997 L'Informatore Agrario, Vol. 16, 62-63. (I)

Communication system in sericulture extension.

Système de communication dans le processus d'extension de la sériciculture.

GUPTA B.K., GUPTA Y.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

1998 Indian Silk, Vol. 36(10), 19-21. (E)

Investigation on the sericultural management on moderate scale in family.

Enquête sur la gestion séricicole à l'échelle de la famille.

HU J., WANG W., SUN Z.

Service Station of Sericultural Technology of Haining City, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(4), 4-6. (C,e)

Discussion on the difficult position encountered by silkworm egg station and its policy.

Discussion sur la position difficile rencontrée par les stations de grainage et leur politique.

HUANG L., SHAO Y., JIN X.

General Silkworm Egg Station of Deqing County, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(4), 10-12. (C,e)

Economics of scale in mulberry sericulture in Tamil Nadu - An analysis.

Economie d'échelle dans la sériculture mûrier au Tamil Nadu - Une analyse.

LAKSHMANAN S., MALLIKARJUNA B., GEETHA DEVI R.G.

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

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(2), 133-137. (E)

Seasonal, spatial and temporal performance of sericulture in Hassan District, Karnataka.

Performance de la sériculture dans le temps, l'espace et les saisons dans le district de Hassan, Karnataka.

MATTIGATTI R., IYENGAR M.N.S., CHIKKANNA, DATTA R.K.

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

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(2), 106-110. (E)

Ecological issues and silk industry.

Problèmes écologiques et industrie de la soie.

NADIGER G.S.

Textiles Committee, Mambai, India.

1998 Indian Silk, Vol. 36(11), 21-26. (E)

Effect of mulberry leaf tea on chronic diseases.

Effet de l'infusion aux feuilles de mûrier sur les maladies chroniques.

NODA S.

1996 Gekkan Fudo Kemikaru, Vol. 12(12), 68-75. (J)

Use of silkworm rearing waste in freshwater prawn culture.

Utilisation des déchets des élevages de ver à soie dans la production de crevettes en eau douce.

SIVASANKAR N., ASHOKA J.

Regional Research Station, Raichur 584 101, India.

1997 Indian J. Seric., Vol. 36(2), 161-163. (E)

Tribes of the world and textile. 5. Production and use of floss silk in Hang-Jia-Hu district.

Tribus du monde et textile. 5. Production et utilisation des déchets de soie dans le district de Hang-Jia-Hu.

SOH K.

1996 Sen'i Seihin Shohi Kagaku, Vol. 37(12), 620-626. (J)

Industrialization is the basic way for sericulture.

L'industrialisation est la voie pour la sériculture.

ZHU L.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(4), 34-35. (C)

Mûrier

Mulberry

Evaluation of mulberry genotypes for saline tolerance by chemo and bio-assays.

Evaluation des génotypes de mûrier pour la tolérance à la salinité par dosages chimiques et biologiques.

AGASTIAN P., VIVEKANANDAN M.

Department of Biotechnology, Bharathidasan University, Tiruchirappalli 620 024, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 142-146. (E)

Studies on the chemistry of the leaves of *Morus alba*.

Etudes sur la chimie des feuilles de *Morus alba*.

ALKOFAMI A., AL-KHALIL S.

1996 *Bull. Fac. Pharm. (Cairo)*, Vol. 34(1), 59-62. (E)

Seasonal variation in ascorbic acid content of promising mulberry genotypes.

Variation saisonnière du titre en acide ascorbique de génotypes de mûriers prometteurs.

CHAKRABARTI S., SINGHAL B.K.

1997 *Indian J. Plant Physiology*, Vol. 1(4), 298-299. (E)

Effect of Cd on quality, physiological and biochemical characteristics of mulberry leaves and its mechanism.

Mécanisme et effet du Cd sur la qualité, les caractéristiques biochimiques et physiologiques des feuilles de mûriers.

CHEN C., GONG H., WANG K.

1996 *Yingyong Shengtai Xuebao*, Vol. 7(4), 417-423. (C)

Test on the residual toxicity of 'Wanling' pesticide on mulberry leaf.

Test de la toxicité résiduelle du pesticide "Wanling" sur les feuilles de mûrier.

CHEN M.

Meicheng Town Agricultural Office of Jiande City, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(4), 19. (C,e)

Propagation of mulberry (*Morus alba* L.) via tissue culture.

Propagation du mûrier (*Morus alba* L.) via la culture de tissus.

EL-KAZZAZ A.A., FAHMY G.E., EL-BAHR M.K., HANAKY M.S., MOGMEN S.H.

1997 *Bull. Natl. Res. Cent. (Egypt)*, Vol. 22(2), 175-188. (E)

Effect of varieties, spacing and fertilizer doses on growth, yield and quality of mulberry.

Effet des variétés, de l'espace et des doses d'engrais sur la croissance, le rendement et la qualité du mûrier.

GHOSH A., AMBIKA P.K., MISHRA R.K.

Regional Sericultural Research Station, Bangalore 560 035, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 138-141. (E)

Effect of culture filtrates of *Alternaria alternata* and *Fusarium pallidoroseum* on seed germination and seedling growth of mulberry.

Effet des filtrats de culture d'*Alternaria alternata* et *Fusarium pallidoroseum* sur la germination des graines et la croissance des semis du mûrier.

GUNASEKHAR V., GOVINDAIAH, CHADRASHEKAR D.S.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 169-171. (E)

Sequential glucosylation determined by NMR in the biosynthesis of mulberroside D, a cis-oxyresveratrol diglucoside, in *Morus alba* L. cell cultures.

Glycosylation séquentielle déterminée par RMN dans la biosynthèse du mulberroside D, un diglucoside cis-oxyresveratrol dans les culture de cellules de *Morus alba* L.

HANO Y., GOI K., NOMURA T., UEDA S.

Toho University, Chiba, Japan.

1997 *Cellular and Molecular Life Sciences (USA)*, Vol. 53(3), 237-241. (E)

Determination of rutin and quercetin from mulberry leave extracts by reversed phase high performance liquid chromatography.

Détermination par chromatographie en phase inversée à haute performance de la rutine et de la quercétine provenant d'extraits de feuilles de mûrier.

JIA Z., WU J., TANG M.

1996 *Sepu*, Vol. 14(6), 489-491. (C)

Soil moisture management in mulberry.

Gestion de l'humidité des sols chez le mûrier.

KANT R., MADHAVA RAO Y.R., SARKAR A.

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(10), 5-7. (E)

Changes in leaf water potential, osmotic adjustment, and proline metabolism in mulberry during water stress.

Changements dans le potentiel en eau des feuilles, l'ajustement osmotique et le métabolisme de la proline chez le mûrier au cours du stress aqueux.

KUMARI B.D.R., VEERANJANEYULU K.

1996 *Isr. J. Plant Sci.*, Vol. 44(2/3), 135-141. (E)

Comparative evaluation of S41 and M5 mulberry genotypes (*Morus* spp.). II. Silkworm rearing with respect to plant spacing and methods of leaf harvest.

Evaluation comparative des génotypes S41 et M5 du mûrier (*Morus* spp.). II. Elevage du ver à soie en fonction des espacements des plants et des méthodes de récolte des feuilles.

MALLIKARJUNAPPA R.S., BONGALE U.D., CHADRAKALA M.V., VENKATESHAIAH H.V.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 164-166. (E)

The toxic components produced by *Myrothecium roridum*, causal fungus of leaf spot of mulberry, and its influence on the pathogenicity.

Les composants toxiques produits par *Myrothecium roridum*, le champignon responsable des taches des feuilles du mûrier et son influence sur la pathogénicité.

MURAKAMI R., SHIRATA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(1), 57-64. (J,e)

Preservation of multiple bud bodies of mulberry (*Morus alba* L.) under low and ultra-low temperatures.

Conservation à basse et ultra-basse températures de corps à multiples bourgeons du mûrier (*Morus alba* L.).

OKA S., NIINO T.

National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 467-472. (J,e)

Micropopagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. syn. *Morus acidosa* Griff.

Micropopagation d'un arbre à fruits *Morus australis* Poir. syn. *Morus acidosa* Griff.

PATTNAIK S.K., SAHOO Y., CHAND P.K.

1996 *Plant Cell Rep.*, Vol. 15(11), 841-845. (E)

A preliminary survey on mulberry diseases in South India.

Une étude préliminaire sur les maladies du mûrier dans le sud de l'Inde.

PHILIP T., GOVINDAJAH, BAJPAI A.K., NAGABHUSHANAM G., NAIDU N.R.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 128-132. (E)

Multivariate analysis as an aid to genotype selection of breeding in mulberry.

L'analyse multivariée comme aide à la sélection du génotype pour le breeding chez le mûrier.

RAJA M.V., CHATURVEDI H.K., SARKAR A.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 111-115. (E)

The reason for the poor quality of autumn leaf and its policy.

Cause et contrôle de la médiocre qualité des feuilles en automne.

SHAN B. et al.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(4), 36-37. (C)

Influence of powdery mildew and leaf spot disease on the enzyme activity in mulberry varieties.

Influence du mildiou poudré et de la maladie des taches de feuilles sur l'activité enzymatique chez les variétés de mûrier.

SHREE M.P., SHIVAKUMAR P., SHANTHI K.R., NATARAJA S.

1997 *Geobios (Jodhpur, India)*, Vol. 24(2/3), 98-102. (E)

Magnesium management in mulberry.

Gestion du magnésium chez le mûrier.

SINGHVI N.R., SUBBASWAMY M.R., DATTA R.K.

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

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(11), 7-9. (E)

Nitrogen nutrition of mulberry - A review.

Nutrition en azote du mûrier - Une revue.

SUBBARAYAPPA C.T., BONGALE U.D.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 92-98. (E)

Biochemical changes in the leaves of mulberry (*Morus alba* L.) infected by *Pseudocercospora mori* (Hara) Deighton.

Variations biochimiques dans les feuilles de mûrier (*Morus alba* L.) infestées par *Pseudocercospora mori* (Hara) Deighton.

TEOTIA R.S., SENGUPTA T., DAS C.

Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko 781 123, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 158-160. (E)

Studies on leaf moisture of mulberry germplasm varieties.

Etudes sur l'humidité des feuilles des variétés du germoplasme du mûrier.

VIJAYAN K. *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura.

Mysore 570 008, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 155-157. (E)

Assessment of mulberry hybrids: a new approach.

Détermination des mûriers hybrides : une nouvelle approche.

VIJAYAN K., CHAKRABORTI S.P., ROY B.N., SARATCHANDRA B.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(11), 11-13. (E)

Preliminary report on the effect of a new fertilizer special for mulberry.

Rapport préliminaire sur l'effet d'un engrais spécial pour le mûrier.

WANG Y. *et al.*

Department of Sericultural Science, Shandong Agricultural University, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(4), 16-18. (C,e)

Effect of gibberellin on flower bud formation in mulberry tree.

Effet de la gibbérelline sur la formation des bourgeons des fleurs chez le mûrier.

XIAN X.

BSI Institute of Biological Science, 2-17-7 Azusawa, Itabasi-ku, Tokyo 174, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 409-412. (J,e)

Effect of three antibiotics and a herbicide on adventitious-bud formation in immature leaf culture and proliferation of multiple-bud body of mulberry.

Effet de trois antibiotiques et d'un herbicide sur la formation des bourgeons adventifs dans une culture de feuilles immature et la prolifération de corps à multiples bourgeons chez le mûrier.

YAMANOUCHI H., OKA S., KOYAMA A., MACHII H., KATAGIRI K.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 493-496. (E)

The reason and policy to the acidification of mulberry field soil in plain Jaihu.

Cause et politique d'acidification des sols des mûraies dans la plaine de Jaihu.

ZHOU Q., ZHANG Y.

Jiaxing Agricultural School of Zhejiang Province, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(4), 1-3. (C,e)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

Effect of hot air temperature and humidity upon silkworm cocoon drying rates.

Effet de la haute température de l'air et de l'humidité sur les taux de séchage des cocons de ver à soie.
CHEN J.

1997 *Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao*, Vol. 14(1), 21-25. (C)

Vijetha : An effective disinfectant.

Vijetha : un désinfectant efficace.

DATTA R.K., BAIG M., NATARAJU B., BALAVENKATASUBBAIAH M., SELVAKUMAR T.
Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura,
Mysore 570 008, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(9), 12-13. (E)

Performance of silkworm (*Bombyx mori* L.) fed mulberry leaves with vitamins and mineral supplements.

Performance du ver à soie (*Bombyx mori* L.) nourri avec des feuilles de mûrier et des compléments de minéraux et de vitamines.

EVANGELISTA A., DE CARVALHO A.D., TAKAHASHI R.

1997 *Rev. Agric. (Piracicaba, Brazil)*, Vol. 72(2), 199-204. (Pt)

Analytical profile of flacherie diseased worms.

Profil analytique des vers atteints de la flacherie.

GANGA M., MURUGAPPAN R., BALAMURUGAN N.

1997 *Geobios (Jodhpur, India)*, Vol. 24(1), 10-12. (E)

"Nursery-guard": a bio-fungicide for nursery management.

"Nursery-guard" : un fongicide biologique pour les nourriceries.

GUPTA V.P.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(10), 8-9. (E)

Effect of two defoliant materials on mulberry trees and silk production of silkworm *Bombyx mori* L.

Effet de deux défoliants sur les mûriers et la production de soie du ver à soie *Bombyx mori* L.

HOSNY A.R., EL-KARAKSY I.A., EL-SAYED M.E.

1996 *Z. Angew. Zool.*, Vol. 81(2), 279-284. (E)

A new kind of antiseptic agent ADA for artificial diet.

Un nouveau type d'agent antiseptique ADA pour l'aliment artificiel.

HUANG J., XU J., ZHANG X.

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1996 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 22(5), 515-518. (C,e)

Vitaminic response of the silkworm, *Bombyx mori*, fed the synthetic diet with different amounts of pyridoxine.

Réponse en vitamines chez le ver à soie *Bombyx mori* nourri avec un aliment synthétique à différentes teneurs en pyridoxine.

HUANG L., ZHANG J., HAYAKAWA T., TSUGE H.

United Graduate School of Agricultural Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1113, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(1), 9-15. (J,e)

Sporogony of a microsporidium, *Nosema* sp. NIS-M11 (Microspora: Nosematidae) in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* raised under two distinct levels of temperature.

Sporogonie d'un microsporidium, *Nosema* sp. NIS-M11 (Microspora : Nosematidae) chez les larves du ver à soie *Bombyx mori* élevés sous deux températures distinctes.

IGUCHI T. *et al.*

Faculty of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisa 252, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 445-452. (J,e)

Efficacy of some bed disinfectants on the grasserie disease in silkworm, *Bombyx mori* L.

Efficacité de quelques désinfectants des litières sur la grasserie chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

JADHAV R.N., SALUNKE S.D., TATTAPURE S.T.

1995 *Curr. Agric. Res.*, Vol. 8(1), 16-20. (E)

Effect of mounting surroundings on the raw cocoons.

Effet de l'environnement de montée sur les cocons bruts.

LIN K., WU X., ZHU L., YAO J.

Haining Silk Corporation of Zhejiang Province, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(4), 22-25. (C,e)

A DNA hybridization taxonomic study of *Enterococci* from the intestine of silkworm.

Etude taxonomique par hybridation d'ADN d'*Enterococci* provenant de l'intestin du ver à soie.

LU X., JIN W., QIAN Y.

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1996 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 22(4), 331-337. (E,c)

Studies on the improvement of the ingredient of artificial diet for silkworm (*Bombyx mori* L.).

Etudes sur l'amélioration des ingrédients de l'aliment artificiel pour le ver à soie (*Bombyx mori* L.).

MIAO Y., XU J., HONG G.

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1996 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 22(5), 511-514. (C,e)

Multiplication of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm larvae during the latter period of the 5th instar.

Multiplication du virus de la polyhédrose nucléaire chez la larve du ver à soie au cours de la dernière période du 5ème âge larvaire.

NAGATA M., SUN P.J.

Laboratory of Sericultural Science, Graduate School of Agriculture & Agricultural Life Science, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 37(1), 23-29. (J,e)

Feeding experiments of polyphagous silkworm larvae on various plant leaves.

Expérimentations sur le nourrissage des larves de ver à soie polyphages avec des feuilles de différents végétaux.

OHNUMA A., TAZIMA Y.

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, Iikura 1053, Amimachi, Ibarakiken 300-03, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 431-437. (J,e)

A correlation between bacterial flacherie and alkaline phosphatase activity in the midgut of silkworm *Bombyx mori* L.

Corrélation entre la flacherie bactérienne et l'activité de la phosphatase alcaline dans l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori* L.

PATHAK J.P.N., SHARMA R.

1996 *Entomon.*, Vol. 21(1), 1-5. (E)

Studies on the economic traits of complex (tetra) hybrids of silkworm moth (*Bombyx mori* L.). II. Reproductive traits.

Etudes des caractères économiques d'hybrides complexes (tétra) de ver à soie (*Bombyx mori* L.). II. Caractères de reproduction.

PETKOV N., NACHEVA Y.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science (Bulgaria)*, Vol. 33(7-8), 65-68. (Bg,r,e)

***In vitro* evaluation of leaf and oil cake extracts of *Azadirachta indica* and *Pongamia glabra* on mulberry root rot pathogens.**

Evaluation *in vitro* des extraits de feuilles et de pains d'huile d'*Azadirachta indica* et de *Pongamia glabra* sur les pathogènes de la pourriture des racines du mûrier.

PHILIP T., SHARMA D.D.

Research Extension Centre, Kidangoor, Angamali 683 572, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 150-152. (E)

Study on artificial induction of *Nosema bombycis* spores.

Etude sur l'induction artificielle des spores de *Nosema bombycis*.

QIAN Y., LU X.

Shaanxi Provincial Institute of Sericulture and Silk Textiles, Zhouzhi, China.

1996 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 22(4), 381-385. (C,e)

Influence of temperature and leaf quality on rearing performance of silkworm, *Bombyx mori* L.

Influence de la température et de la qualité des feuilles sur les performances d'élevage du ver à soie *Bombyx mori* L.

SHIVA KUMAR C., SEKCHARAPPA B.M., SARANGI S.K.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 116-120. (E)

Role of soyabean protein in silkworm nutrition.

Rôle des protéines des graines de soja dans la nutrition des vers à soie.

SUBBU RATHINAM K.M., KRISHNAN M.

Department of Biotechnology, J.J. College for Arts and Science, Pudukottai, Tamil Nadu, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(11), 9-10. (E)

Nutritional studies on mulberry in relation to cocoon production.

Etudes nutritionnelles sur le mûrier en relation avec la production de cocons.

SUNDARESWARAN P. *et al*

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 147-149. (E)

The disinfection effect of chlorine dioxide on pathogene of silkworm (*Bombyx mori* L.)

L'effet de désinfection du dioxyde de chlore sur les pathogènes du ver à soie (*Bombyx mori* L.).

TIAN C., MA X.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei, China.

1996 Journal of Anhui Agricultural University (China), Vol. 23(4), 525-528. (C,e)

Comparison test on the silkworm eggs for summer-autumn rearing in Zhejiang Province and its evaluation.

Test de comparaison des oeufs de ver à soie pour l'élevage d'automne-été dans la province de Zhejiang.

WU H. *et al.*

Silkworm Egg Company of Zhejiang Province, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(4), 7-9. (C,e)

Artificial diet mainly consisting of soyabean for silkworm (*Bombyx mori* L.) and rearing of the fifth instar larvae with it.

Aliment artificiel principalement constitué de graines de soja et son application à l'élevage du ver à soie (*Bombyx mori* L.) au quatrième âge.

WU X., XU J., MIAO Y., ZENG S.

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1996 Journal of Zhejiang Agricultural University (China), Vol. 22(4), 369-372. (C,e)

Effect of protein content in a semi-synthetic diet on the fourth instar larvae of the silkworm (*Bombyx mori*).

Effet du titre en protéines dans une alimentation semi-synthétique au quatrième âge larvaire chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

ZHANG C., HU C., XU J., PAN Q.

Department of Plant Protection, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1996 Journal of Zhejiang Agricultural University (China), Vol. 22(5), 448-451. (E,c)

Technology of rearing grown silkworm with film twice a day during summer-autumn rearing seasons.

Technologie d'élevage utilisant un film deux fois par jour pour les vers à soie en croissance au cours des saisons d'élevage d'automne-été.

ZHANG P. *et al.*

Suburban Agricultural Bureau of Jiaxing City, China.

1997 Bulletin of Sericulture, Vol. 28(4), 20-21. (C,e)

Protection of *Bombyx mori* cells by ribozyme against nuclear polyhedrosis virus infection.

Protection des cellules de *Bombyx mori* par le ribozyme contre l'infection du virus de la polyédrose nucléaire.

ZHANG X., ZHANG F., QI G., LU C.

1997 Gaojishu Tongxun, Vol. 7(4), 23-27. (C)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Effect of gibberellic acid (GA3) on germination and seedling growth of three host plants of tasar silkworm.

Effet de l'acide gibbéréllique (GA3) sur la germination et la croissance des semis de trois plantes hôtes du ver à soie tasar.

ASHOK P., PRASAD U.S.

Bihar Institute of Silk and Textiles, Nathnagar, Bhagalpur, 812 006, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 153-154. (E)

Muga : production and marketing constraints.

Muga : contraintes de production et de commercialisation.

BORGOHAIN-SARMA M., CHAUDHURI M.

TSTC, Sualkuchi, Assam, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(9), 18-19. (E)

Blue ! The breed is true !!

Bleue ! La variété existe vraiment !!

CHAUDHURI M. *et al.*

Muga Seed Development Project, Guwahati, Assam, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(9), 14-16. (E)

Effect of Ga3 on leaf constituents of *Quercus serrata* and its impact on rearing performance of silkmoth (*Antheraea proleyi* J.).

Effet du Ga3 sur les constituents de *Quercus serrata* et son impact sur les performances d'élevage du papillon *Antheraea proleyi* J.

GHOSH M., SRIVASTAVA R.C.

1997 *Polym. Prepr. (Am. Cham. Soc., Div. Polym. Chem.)*, Vol. 38(2), 73-74. (E)

Effect of ammonium sulfate on leaf constituents of *Quercus serrata* and its correlation with oak-tasar silkworm (*Antheraea proleyi* J.).

Effet du sulfate d'ammonium sur les composants des feuilles de *Quercus serrata* et sa corrélation avec le ver à soie tasar du chêne (*Antheraea proleyi* J.).

GHOSH M.K., SRIVASTAVA R.C.

1996 *Natl Acad. Sci. Lett. (India)*, Vol. 19(3/4), 53-58. (E)

Study of white *Antheraea pernyi* silkworm cocoon layer by IR and UV.

Etude aux IR et aux UV des couches du cocon du ver à soie *Antheraea pernyi* blanc.

Ji T. et al.

1996 *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, Vol. 16(5), 38-42. (C)

Effect of washing and disinfection method and rearing types on cocooning rate of *Antheraea yamamai* Guenee.

Effet de la méthode de lavage et de désinfection et des types d'élevage sur le taux de coconage d'*Antheraea mylitta* Guenee.

LIU C., LU Z.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei, China.

1996 *Journal of Anhui Agricultural University*, Vol. 23(1), 39-42. (C,e)

An effective removal method of the egg shell for artificial hatching of the wild silkmoth, *Antheraea yamamai*.

Une méthode efficace pour enlever la coque des oeufs pour l'éclosion artificielle du séricigène sauvage *Antheraea yamamai*.

MITAMURA T.

Fukushima Sericultural Experiment Station, 21 Kitamotomachi, Yanagawa-machi, Fukushima 990-0781, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(1), 73-75. (J,e)

Impact of pruning of muga silkworm food plants.

Impact de la taille des plantes hôtes du ver à soie muga.

SIDDIQUI A.A., LAL B., DAS P.K.

Regional Muga Research Station, Boko, Kamrup, Assam, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(11), 18-20. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Study on the usage of sex-limited translocation in *Bombyx mori*.

Etude sur l'utilisation de la translocation limitée au sexe chez *Bombyx mori*.

DING N., JIN Y., SHEN J., FENG J., ZHANG S.

Huzhou Institute of Sericulture, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(4), 26-30. (C,e)

A novel member of leucocin gene family from the silkworm, *Bombyx mori*.

Un nouveau membre de la famille du gène de la lébocine chez le ver à soie *Bombyx mori*.

FURUKAWA S., TANAI K., ISHIBASHI J., HARA S., SHONO T., YAMAKAWA M.

1997 *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 238, 769-774. (E)

Characterization of S1 nuclease sensitive sites at transcription initiation region of *Attacus ricini* rDNA.

Caractérisation des sites sensibles à la nucléase S1 dans la région d'initiation de la transcription de l'ADNr d'*Attacus ricini*.

HE M., ZHAO M., JIN J., LI Z.

1997 *Sci. China Ser. C: Life Sci.*, Vol. 40(4), 398-405. (C)

The DNA sequence and structural characteristics of the 5'-non transcribed spacer of silkworm *Attacus ricini* rDNA.

Séquence et caractéristiques structurales de l'espaceur 5' non transcrit dans l'ADNr du ver à soie *Attacus ricini*.

HE M., ZHAO M., JIN J., LI Z.

1996 *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao*, Vol. 28(6), 616-623. (C)

Effect of certain fungicides on the induction of dominant lethals in silkworm, *Bombyx mori* L.

Effet de certains fongicides sur l'induction de létaux dominants chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

HIRIYANNA S.G.

1996 *J. Environ. Biol.*, Vol. 17(4), 273-277. (E)

Genetic analysis of a new mutant expressing extra-legs and extra-wings at the adult stage in the silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse génétique d'un nouveau mutant ayant des pattes et des ailes supplémentaires à l'âge adulte chez le ver à soie *Bombyx mori*.

HIROKAWA M.

Fukushima Sericultural Experiment Station, 21 Kitamotomachi, Yanagawa-Machi, Date-Gun, Fukushima 960-0781, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(1), 1-7. (E,j)

Detection of the silkworm-pathogenic virus genomes by PCR.

Détection par PCR des génomes des virus pathogènes du ver à soie.

KAGEYASU S., HAYAKAWA T., ISAWA H., ASANO S., SAHARA K., IIZUKA T., BANDO H.

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 477-483. (J,e)

YAC-based transfer of fibroin gene from *Antheraea yamamai* to *Bombyx mori*: expression of *A. yamamai* fibroin gene in *B. mori*.

Transfert par YAC du gène de la fibroïne d'*Antheraea yamamai* chez *Bombyx mori*; expression du gène de la fibroïne d'*A. yamamai* chez *B. mori*.

LI Z., ZHOU C., TANG H.

1997 *Kunchong Xuebao*, Vol. 40(1), 1-6. (C)

Establishment of gene marker for silk protein in silkworm.

Etablissement d'un marqueur de gène pour la protéine de soie chez le ver à soie.

LU C.

College of Sericulture, Southwest Agricultural University, Chongqing, China.

1996 *Journal of Southwest Agricultural University (China)*, Vol. 18(2), 100-102. (C,e)

Polymorphism analysis of restricted fragment length of fibroin gene (pFb 2.9) in silkworm.

Analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction du gène de la fibroïne (pFb 2.9) chez le ver à soie.

LU C.

College of Agriculture, Southwest Agricultural University, Chongqing, China.

1996 *Journal of Southwest Agricultural University (China)*, Vol. 18(2), 103-105. (C,e)

Detection of mutagens in *Bombyx mori*.

Détection des mutagènes chez *Bombyx mori*.

MARAKAMI A.

1995 *Ko Hen'igen Hatsugan Busshitsu to Sono Kensakubo*, 259-277. (J)

***In vitro* transcription systems from cultured cells and fat-body tissue of the silkworm *Bombyx mori*.**

Systèmes de transcription *in vitro* à partir de cultures de cellules et du tissu du corps adipeux du ver à soie *Bombyx mori*.

MINE E., SAKURAI H., IZUMI S., TOMINO S.

1997 *Mol. Biotechnol.*, Vol. 8(1), 79-88. (E)

Studies on binding affinity of HMG-B from silkworm, *Bombyx mori* and HMG-D from *Drosophila* with monomer nucleosomes.

Etudes sur l'affinité de liaison de HMG-B provenant du ver à soie *Bombyx mori* et de HMG-D provenant de la drosophile avec des nucléosomes monomères.

MUKHERJEE A.S., PATHAK K., KUNDU J., GHOSH S.

Genetics Research Unit, Department of Zoology, Calcutta University, Calcutta 700 019, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 99-105. (E)

Some genetic parameters of basic quantitative characteristics of two sex androgenetic line populations of silkworm.

Quelques paramètres génétiques des caractéristiques quantitatives de base de deux populations de lignées androgénétiques du ver à soie.

NACHEVA Y., PETKOV N., MALINOVA K.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science (Bulgaria)*, Vol. 33(7-8), 61-64. (Bg,r,e)

Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its significance in silkworm, *Bombyx mori*.

Détermination de la diversité génétique par profils d'ADN et sa signification chez le ver à soie *Bombyx mori*.

NAGARAJU J.G., SINNGH L.

1997 *Electrophoresis*, Vol. 18, 1676-1681. (E)

Degrees of genetic difference between parental lines of silkworm moth (*Bombyx mori* L.) hybrids.

Degrés de différence génétique entre lignées parentales d'hybrides de ver à soie (*Bombyx mori* L.).

PETKOV N.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science (Bulgaria)*, Vol. 33(7-8), 58-60. (Bg,r,e)

Short term selection for pupal weight in the silkworm *Bombyx mori* L. - I. Direct response.

Sélection rapide pour le poids de la pupa chez le ver à soie *Bombyx mori* L. - I. Réponse directe.

PUTTARAJU H.P., RAJANNA K.L.

Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560 056, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 121-127. (E)

Isolation and particular expression of a new beta-tubulin gene in wing discs during metamorphosis of *Bombyx mori*.

Isolement et expression particulière d'un nouveau gène de la beta-tubuline dans les disques alaires au cours de la métamorphose chez *Bombyx mori*.

QUAN G.X., KANKE E., KAWASAKI H.

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine, Utsunomiya, Tochigi 321-0942, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(1), 43-50. (E,J)

Aberrant meiotic behavior of chromosomes due to reciprocal translocation in the E(Ds) mutant of the silkworm, *Bombyx mori*.

Comportement méiotique aberrant des chromosomes dû à la translocation réciproque chez le mutant E(Ds) du ver à soie *Bombyx mori*.

SAKAIDA K., BANNO Y., NAKAMURA T., KAWAGUCHI Y., KOGA K., DOIRA H.

1996 *Hereditas*, Vol. 125(1), 25-29. (E)

The silkworm. Biology, genetics and breeding.

Le ver à soie. Biologie, génétique et breeding.

SARKAR D.D.

1998 *Vikas Publishing House PVT Ltd*, 576 Masjid Road, Jangpura, New Delhi 110 014, India, 338 p. (E)

Expression of individual members of a tRNA(1)Gly multigene family *in vivo* follows the same pattern as *in vitro*.

L'expression *in vivo* des membres individuels d'une famille des multigènes de l'ARNt-Gly1 suit le même schéma qu'*in vitro*.

SHARMA S., SRIRAM S., PATWARDHAN L., GOPINATHAN K.P.,

1997 *Gene*, Vol. 194, 257-266. (E)

Expression of biologically active human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the silkworm (*Bombyx mori*).

Expression du facteur stimulateur de colonies de macrophages granulocytes humains biologiquement actif chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

SHI X., QIN J., ZHU J., ZHU D.

1996 *Biotechnol. Appl. Biochem.*, Vol. 24(3), 245-249. (E)

Expression of human bone morphogenetic protein 2 in *Bombyx mori* larvae and its purification.

Expression de la protéine 2 morphogénétique d'os humain chez les larves de *Bombyx mori* et sa purification.

SONG L., MI Y., DAI N., WU X., LI B.

1996 *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao*, Vol. 28(4), 374-379. (C)

Structure of trehalase gene of the silkworm, *Bombyx mori* and phylogenic relationship of trehalases.

Structure du gène de la tréhalase du ver à soie *Bombyx mori* et relations phylogénétiques des tréhalases.

SU Z.H., ITANI Y., YAMASHITA O.

Laboratory of Sericultural Science and Entomoresources, School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 454-465. (E,j)

Multiprotein bridging factor 1 (MBF 1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TAT element-binding protein.

Le facteur de pontage multiprotéines 1 (MBF 1) est un coactivateur transcriptionnel conservé au cours de l'évolution et qui se connecte à un facteur de régulation et à la protéine liante à l'élément TATA.

TAKEMARU K.I., LI F., UEDA H., HIROSE S.

1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, 7251-7256. (E)

The recombination and expression of a chimeric antibody light chain gene in cells of silkworm *Bombyx mori*.

La recombinaison et l'expression d'un gène chimérique d'un anticorps de la chaîne légère dans les cellules du ver à soie *Bombyx mori*.

YANG G., WU X., ZHANG W., LI S.

1996 *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao*, Vol. 14(1), 12-16. (C)

Design and property of triplet ribozyme targeting *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) immediate early gene.

Motif et propriétés des ribozymes ciblant les gènes précoces du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* (BmNPV).

ZHANG X., CHEN N., QI G., LU C.

1996 *Bingdu Xuebao*, Vol. 12(4), 374-380. (C)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Effect of moisture absorption on the thermal properties of *Bombyx mori*.

Effet de l'absorption d'humidité sur les propriétés thermiques de *Bombyx mori*.

AGARWAL N., HOAGLAND D.A., PARRIS R.J.

1997 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 63, 401-410. (E)

Cholinergic and serotonergic control of prothoracicotropic hormone release during the pupal stage of the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

Contrôle sérotonergique et cholinergique de la libération de l'hormone prothoracicotrope au cours du stade chrysalide du ver à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

AIZONO Y., YMAMDA T., HIROOKA K., TAKEDA M., MATSUBARA F., SHIRAI Y.

1997 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 32, 508-511. (E)

Structure-activity relationships of cyclopropene compounds, inhibitors of pheromone biosynthesis in *Bombyx mori*.

Relation activité-structure des composés de cyclopropène, inhibiteurs de la biosynthèse de phéromone chez *Bombyx mori*.

ANDO T., OHNO R., IKI MOTO K., YAMAMOTO M.

1996 *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 44, 3350-3354. (E)

Capillary GC/MS characterization of fatty acids from indigenous silkworm oil.

Caractérisation par GC/MS capillaire des acides gras provenant de l'huile de ver à soie indigène.

DODEANU C., RADULESCU V., EFSTATIADE D.M., RUSU V., COVACI A.

1997 *J. Microcolumn Sep.*, Vol. 9(1), 37-41. (E)

An endogenous elevation of cGMP increases the excitability of identified insect neurosecretory cells.

Une élévation endogène de cGMP augmente l'excitabilité de cellules neurosécrétrices identifiées d'insectes.

GAMMIE S.C., TRUMAN J.W.

Zoology Department, Box 351800, University of Washington, Seattle, WA 98195-1800, USA.

1997 *J. Comp. Physiol. A*, Vol. 180, 329-337. (E)

Preparation of chitin from cuticle of silkworm and beetle.

Préparation de chitine à partir de la cuticule du ver à soie et du scarabée.

HAGA A., ZHANG M.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(1), 17-21. (J,e)

Occurrence of a tetrahydrobiopterin synthesizing enzyme distinct from sepiapterin reductase from normal strain of the silkworm, *Bombyx mori*.

Présence d'une enzyme synthétisant la tétrahydrobioptérine distincte de la sépiaptérine-réductase provenant d'une souche normale de vers à soie *Bombyx mori*.

IINO T., ITOH N., SAWADA H., TAKIKAWA S.I., YAMAMOTO T.

Department of General Studies, Nihon University, 3-25-40 Sakurajosui, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 439-444. (E,j)

Hydroxy indole-O-methyl transferase activity in the silkworm (*Bombyx mori*).

Activité de l'hydroxy indole-O-méthyl transférase chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

ITOH M.T., NOMURA T., SUMI Y.

1997 *Brain Res.*, Vol. 765(1), 61-66. (E)

Comparison of glucose-lowering activity of the extracts from Kangwoon-do mountain mulberry leaves (*Mori folium*) and silkworm.

Comparaison de l'activité de diminution de la glycémie des extraits de feuilles de mûrier des montagnes de Kangwoon-do (*Mori folium*) et du ver à soie.

KIM S.H., KIM K.S., LEE J.H., CHUNG E.K., PARK Y.S., PARK Y.J., LEE H.Y.

1997 *Sanop Misaengmul Hakhoechi*, Vol. 25(4), 391-395. (K)

Bioactive constituents of *Morus australis* and *Broussonetia papyfera*.

Constituents biologiques actifs de *Morus Australis* et *Broussonetia papyfera*.

KO H., YU S., KO F., TENG C., LI C.

1997 *J. Nat. Prod.*, Vol. 60, 1008-1011. (E)

Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*.

Protéines liantes aux lipopolysaccharides et leur implication dans l'élimination bactérienne de l'hémolymphe du ver à soie *Bombyx mori*.

KOIZUMI N., MOROZUMI A., IMAMURA M., TANAKA E., IWAHANA H., SATO R.

1997 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 248, 217-224. (E)

Metabolic role of the multiple forms of glucose-1-phosphatase, NAD⁺- and NADP⁺-dependent sorbitol dehydrogenases, acid phosphatases, and glucose-6-phosphate dehydrogenase in tissues and organs of the silkworm.

Rôle métabolique des multiples formes de la glucose-1-phosphatase, des sorbitol-déshydrogénases dépendantes de NAD⁺ et de NADP⁺, des phosphatases acides et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les tissus et les organes du ver à soie.

KONICHEV A.S.

1997 *Biochemistry*, Vol. 62(5), 543-550. (E)

Identification of cytoskeletal proteins in the antennae in the silkmoths *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*.

Identification des protéines cytosquellétiques des antennes des papillons *Antheraea polyphemus* et *Antheraea pernyi*.

KUMAR G.L., MAIDA R., KEIL T.A.

1996 *NeuroReport*, Vol. 7, 1985-1989. (E)

***Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxin affects the K⁺/amino acid symport in *Bombyx mori* larval midgut.**

La delta-endotoxine CryIA de *Bacillus thuringiensis* affecte le transport acides aminés/K⁺ dans l'intestin moyen de la larve de *Bombyx mori*.

LEONARDI M.G., PARENTI P., CASARTELLI M., GIORDANA B.

1997 *J. Membr. Biol.*, Vol. 159, 209-217. (E)

Analysis of the silkworm's shape distribution and serial shape changes in the course of spinning.

Analyse de la distribution de la forme du ver à soie et changements de la forme au cours du filage.

MIURA M., JUAN P.Z., AOYAMA S., MORIKAWA H., MOCHIZUKI S.

Faculty of Textiles Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386-0018, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 67(1), 51-56. (E,j)

Etude du mode d'action d'un régulateur de croissance d'insectes, le Fénoxycarbe, chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

Study on the mode of action of an insect growth regulator, Fenoxycarb, in the silkworm, *Bombyx mori*.

MONCONDUIT H.

INRA, Unité nationale séricicole, 25 quai Jean-Jacques Rousseau, 69350 La Mulatière, France.

1998 *Thèse de Doctorat d'Université Paris VI, Spécialité : Biologie des organismes*. 115 p. (F)

Changes in the activities of aldolase and other enzymes for carbohydrate metabolism during embryonic and postembryonic development of *Bombyx mori*.

Changements dans les activités de l'aldolase et d'autres enzymes du métabolisme des hydrates de carbone au cours du développement embryonnaire et postembryonnaire de *Bombyx mori*.

NAGAOKA S., SUGIMOTO Y., YARA M., KOGA K.

1997 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 36(2), 139-148. (E)

Toxic impact of organophosphorus insecticides on the growth and economic characters of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Impact toxique des insecticides organophosphorés sur la croissance et les caractères économiques du ver à soie *Bombyx mori* L.

NATH B.S., RAJU C.S., SURESH A., KUMAR R.P.S.

1997 *J. Environ. Biol.*, Vol. 18(2), 181-184. (E)

Dissociation of eusperm bundles by acids, especially by succinate accumulated in the spermatophore in the silkworm, *Bombyx mori*.

Dissociation des paquets de sperme par des acides, spécialement par l'acide succinique accumulé dans le spermatophore du papillon *Bombyx mori*.

OSANAI M., ISONO M.

1997 *Invertebrate Reproduction and Development*, Vol. 31, 99-108. (E)

Studies on extraction of oil from silkworm pupa.

Etudes sur l'extraction de l'huile des chrysalides de ver à soie.

QIAN J.

1996 *Zhejiang Gongye Daxue Xuebao*, Vol. 24(2), 166-171. (C)

Influence of thyroxine on different ion dependent ATPase activities in fat body of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.

Influence de la thyroxine sur les activités des ATPase dépendantes de différents ions chez le corps adipeux du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D.

REDDY K.D., CHAUDHURI A., THANGAVELU K.

1996 *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 104(1), 20-28. (E)

Effect of cobalt on the nitrogenous end products of silkworm *Bombyx mori* L.

Effet du cobalt sur les produits finis azotés du ver à soie *Bombyx mori* L.

SAILAJA K., PUSHPA RANI P., MURALI MOHAN P., BHARATHI D.

1997 *Environ. Ecol.*, Vol. 15(1), 151-153. (E)

Effect of cobalt on the growth pattern of silkworm *Bombyx mori* L.

Effet du cobalt sur le schéma de croissance du ver à soie *Bombyx mori* L.

SAILAJA K., PUSHPA RANI P., MURALI MOHAN P., BHARATHI D.

1997 *Environ. Ecol.*, Vol. 15(1), 130-132. (E)

Circadian clock neurons in the silkworm, *Antheraea pernyi*: novel mechanisms of period protein regulation.

Neurones de l'horloge circadienne chez le papillon à soie *Antheraea pernyi*: nouveaux mécanismes de la régulation des protéines de rythme.

SAUMAN L., REPPERT S.M.

1996 *Neuron*, Vol. 17, 889-900. (E)

Properties of ommochrome-binding proteins from the pigment granules in epidermal cells of the silkworm, *Bombyx mori*.

Propriétés des protéines de fixation à l'ommochrome provenant des granules de pigments des cellules épidermiques du ver à soie *Bombyx mori*.

SAWADA H., IINO T., TSUSUE M.

Center of Liberal Arts and Sciences, Kitasato Univ., Kitasato 1-15-1, Sagami-hara City 228, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 393-402. (Ej)

Precocious metamorphosis-inducing activity of 1-substituted imidazole.

Activité de l'imidazole 1-substitué induisant la métamorphose précoce.

SHIMAZU K., SHIMIZU M., SUZUKI K., KUWANO E.

1996 *Nippon Noyaku Gakkaishi*, Vol. 21(3), 337-339. (J)

Variations in carbohydrate content in the larval hemolymph of different eco-races of *Antheraea mylitta* Drury.

Variations du titre en carbohydrate dans l'hémolymph larvaire de différentes éco-races d'*Antheraea mylitta* Drury.

SINHA U.S.P., SINHA A.K., BANERJEE N.D., SINHA B.R.R.P., SINHA S.S.

1997 *Geobios (Jodhpur, India)*, Vol. 24(1), 68-70. (E)

Ecosanoids mediate modulation responses to bacterial infections in larva of the silkworm, *Bombyx mori*.

Réponses modulées par les écosanoïdes à l'infection bactérienne chez la larve du ver à soie *Bombyx mori*.

STANLEY-SAMUELSON D.W., et al.

1997 *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 118A, 93-100. (E)

Angiotensin1-converting enzyme inhibitory peptides derived from silk protein.

Des peptides inhibiteurs d'enzymes convertissant l'angiotensine I, dérivés de la protéine de soie.

TANIGUCHI K., TOMITA T., YAMAGAMI Y.

1997 *Meiji Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku*, Vol. 112, 1-19. (J)

Alterations of ecdysteroid titer and spinning by juvenile hormone analog R394 in silkworm, *Bombyx mori*.

Altérations du titre en ecdystéroïde et du filage par l'analogue R394 de l'hormone juvénile chez le ver à soie *Bombyx mori*.

TRIVERDY K., PORCHERON P., LAFONT R., MAGADUM S.B., DATTA R.K.

1996 *Indian J. Exp. Biol.* Vol. 34(6), 543-546. (E)

The effect of heat shock in the activities of antioxidative enzymes in silkworm.

Effet du choc thermique sur les activités des enzymes anti-oxydantes chez le ver à soie.

YANG T., MEI S.

1996 *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan*, Vol. 23(2), 153-156. (C)

Adhesive strength of the glue substances in the colleterial glands of the silkworm, *Bombyx mori*.

Force d'adhésion des glues dans les glandes collétériques du papillon *Bombyx mori*.

YOSHIDA K., NAGATA M.

Graduate School of Agriculture and Agricultural Life Science, University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 453-456. (E)

Study on phosphate absorption in the midguts of deep fluoride poisoned silkworm larvae.

Étude sur l'absorption de phosphate dans les intestins moyens des larves de ver à soie gravement empoisonnées par le fluor.

ZANG R., LU S.

Central Laboratory, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1996 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 22(6), 595-597. (C,e)

Vers à soie : œufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Effect of fluoride pollution on fecundity of *Bombyx mori*.

Effet de la pollution du fluorure sur la fécondité chez *Bombyx mori*.

CHIEN Y., SHAO S., WU T., WU Y.

1996 *Yingyong Shentai Xuebao*, Vol. 7(4), 424-428. (C)

Diapause breakdown by an imidazole derivative, KK-42, in pharate first-instar larvae of *Antheraea yamamai* deprived of egg shell by treatment with high chlorinated lime solution.

Interruption de la diapause par un dérivé d'imidazole, le KK-42, chez les larves embryonnaires d'*Antheraea yamamai* privées de chorion par une solution de chaux à haute teneur en chlore.

FUKUMOTO M., NAKAGAKI M., KANDA T., KURIBAYASHI S.

Nagano Nanshin Agricultural Experiment Station, Shimoichida 2 476, Takamori-machi, 399-3103, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(1), 65-71. (J,e)

Female accessory glands (colleterial glands) of the wild silkmooths and their secretory proteins. Glandes accessoires (glandes collatériques) de la femelle des papillons sauvages et leurs protéines sécrétées.

KAJHURA S., OHSHIMA T., NAKAGAKI M., TAKEI R.

Faculty of Textiles Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda-shi, Nagano-ken 386-8567, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 413-419. (J,e)

Alteration of egg character in the emi mutation of *Bombyx mori* by the application of 20-hydroxyecdysone.

Altération des caractères des oeufs dans la mutation emi chez *Bombyx mori* par l'application de 20-hydroxyecdysone.

KAWAGUCHI Y., IWAKUMA M., BANNO Y., KOGA K.

Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University., Hokozaeki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(1), 31-35. (E,j)

Discussion on the oviposition promoter of silkworm (*Bombyx mori*) once again.

Nouvelle discussion sur le promoteur de l'oviposition du ver à soie (*Bombyx mori*).

LU X., ZHENG D., ZHU G.

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, China.

1997 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 28(4), 31-33. (C,e)

Ovipositional response of two new breeds of mulberry silkworms to substrata.

Réponse ovipositionnelle aux substrats de deux nouvelles lignées de ver à soie du mûrier.

NANGIA N., RAMAKUMAR S.R.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore 560 065, India.

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 167-168. (E)

Period protein is necessary for circadian control of egg hatching behavior in the silkworm, *Antheraea pernyi*.

La protéine de rythme est nécessaire au contrôle circadien du comportement d'éclosion des oeufs chez le ver à soie *Antheraea pernyi*.

SAUMAN L., TSAI T., ROCA A.L., REPERT S.M.

1996 *Neuron*, Vol. 17, 901-909. (E)

Artificial parthenogenesis in the silkworm *Bombyx mori* L. - A review.

Parthénogénèse artificielle chez le ver à soie *Bombyx mori* L. - Une revue.

SINGH R., AHSAN M.M., DATTA R.K.

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

1997 *Indian J. Seric.*, Vol. 36(2), 87-91. (E)

Characterization of ion channel-like activity derived from unfertilized eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.

Caractérisation d'une activité analogue au canal d'ions chez des oeufs non fécondés du ver à soie *Bombyx mori*.

TOSHIMA Y.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 421-430. (J,e)

The basic race breeding of rich egg laying variety of silkworm (*Bombyx mori* L.).

La sélection de la souche de base de la variété du ver à soie (*Bombyx mori* L.) donnant beaucoup d'oeufs.

WU Y., TU Z.

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1996 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 22(4), 377-380. (C,e)

Change of electric potential in the silkworm egg during the embryogenesis induced by artificial hatching.

Changement du potentiel électrique dans les oeufs de ver à soie au cours de l'embryogenèse induite par artificiellement.

XIAN X., KOBAYASHI M.

BSI Institute of Biological Science, 2-17-7 Azusawa, Itabasi-ku, Tokyo 174, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 485-487. (J)

The effect of EGTA injected into female pupa of the silkworm, *Bombyx mori*, on the diapause of eggs.

L'effet de l'EGTA injecté dans les chrysalides femelles du ver à soie *Bombyx mori* sur la diapause des oeufs.

XIAN X., OZAKI M., KOBAYASHI M.

BSI Institute of Biological Science, 2-17-7 Azusawa, Itabasi-ku, Tokyo 174, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 403-408. (J,e)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silk glands

Organic composition of silk gland of silkworm larvae *Bombyx mori* L. on exposure to prostaglandin F2alpha.

Composition organique de la glande séricigène du ver à soie *Bombyx mori* L. exposée à la prostaglandine F2alpha.

BHARATHI D., PADMASRI T.

1996 *Environ. Ecol.*, Vol. 14(2), 351-353. (E)

Regulation of juvenile hormone analog on protein synthesis in the silk gland and fat body of silkworm, *Bombyx mori*.

Régulation par l'analogue d'hormone juvénile de la synthèse des protéines dans la glande séricigène et le corps adipeux du ver à soie, *Bombyx mori*.

DAI Y., JIN X.

1997 *Kunchong Xuebao*, Vol. 40(1), 45-50. (C)

The effect of gamma irradiation on some morphological and quantitative changes of *Bombyx mori* L. gland.

L'effet de l'irradiation aux rayons gamma sur quelques changements quantitatifs et morphologiques de la glande de *Bombyx mori* L.

PETKOV N., MALINOVA K., BINH N.T.T.

Experimental Station of Sericulture, Mito Orozov Str. No 24, Vratsa 3000, Bulgaria.

1996 *Journal of Animal Science (Bulgaria)*, Vol. 33(7-8), 69-72. (Bg,r,e)

Aminoacid composition of fibroin protein in posterior silk gland of *Bombyx mori* influenced by different types of mulberry leaves.

Composition en acides aminés de la fibroïne dans la glande séricigène postérieure de *Bombyx mori* influencée par différents types de feuilles de mûriers.

QADER M.A., HAQUE M.T.

1997 *Pak. J. Zool.*, Vol. 29(2), 161-164. (E)

Study on the effect of ration feeding on silk gland growth.

Etude de l'effet de l'alimentation sur la croissance de la glande séricigène.

TU Z., ZHOU Y.

Department of Sericultural Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1996 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 22(4), 349-352. (C,e)

Soie

Silk

NMR study of fiber structure.

Etude NMR de la structure de la fibre.

ASAKURA T.

1997 *Sen'i Gakkaishi*, Vol. 53(9), 300-304. (J)

X-ray diffraction from single fibers of spider silk.

Diffraction aux rayons X des fibres simples de la soie d'araignée.

BRAM A., BRANDEN C.I., SNIGIVERA I., RIEKEL C.

1997 *J. Appl. Crystallogr.*, Vol. 30(3), 390-392. (E)

Printing of silk : reactive dye fixation methods.

Impression de la soie : méthodes de fixation de la teinture .

CHATTOPADHYAY D.P., BHADRA I.

Technological Institute of Textile and Sciences, Bhiwani, Haryana, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(10), 27-29. (E)

Conformation transition of silk fibroin induced by blending chitosan.

Transition de la conformation de la fibroïne de soie induite par un mélange de chitosan.

CHEN X., LI W., YU T.

1997 *J. Polym. Sci., Part B. Polym. Phys.*, Vol. 35, 2293-2296. (E)

pH sensivity and ion sensivity of hydrogels based on complex-forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network.

Sensibilité au pH et aux ions des hydrogels formés d'un complexe formant un réseau de polymères chitosan-soie .

CHEN X., LI W., ZHONG W., LU Y., YU T.

1997 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 65, 2257-2262. (E)

Structure and function of minor ampullate silk proteins from *Nephila clavipes*.

Structure et fonction des protéines de soie ampoulaire de *Nephila clavipes*.

COLGIN M.A.

1996 *Thesis, University of Wyoming (Laramie), USA.* (E)

Innovative reuse of sericine after degumming of reeled silk waste material.

Réutilisation innovatrice de la séricine après le décreusage des déchets de soie dévidée.

DUTTA B.B., TARAPOREWALA K.S.

1997 *Man-Made Text. India*, Vol. 40(9), 379-380. (E)

Aging of silk fabrics produced in Meiji era and Taisho-Showa era.

Veillissement des tissus de soie produits à l'ère Meiji et à l'ère Taisho-Showa.

FUJI K., SAKAI T., KAWAMURA M.

1996 *Kyoritsu Joshi Daigaku Kaseigakubu Kiyo*, Vol. 42, 45-52. (J)

Physical properties and structure of poly-ethyleneglycol-silk fibroin conjugate films.

Propriétés physiques et structure des films conjugués de fibroïne de soie et de poly-éthylène glycol.

GOTH Y., TSUKADA M., BABA T., MINOURA N.

1997 *Polymer*, Vol. 38(2), 487-490. (E)

Synthesis of poly-ethylene-glycol - silk fibroin conjugates and surface interaction between L-929 cells and the conjugates.

Synthèse des conjugués fibroïne de soie - poly-éthylène glycol et interaction des surfaces entre les cellules L-929 et les conjugués.

GOTOH Y., TSUKADA M., MINOURA N.

1997 *Biomaterials*, Vol. 18, 267-271. (E)

Structural changes of spider silk on supercontraction.

Changements structuraux de la soie d'araignée en supercontraction.

GRUBB D.T., JACKREL D., JELINSKI L.W.

1997 *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*, Vol. 38(2), 73-74. (E)

Degumming treatment of spun silk fabrics.

Décreusage enzymatique des tissus de soie.

GULRAJANI M.L., ARORA S., AGGARWAL S.

1997 *Indian J. Fibre Text. Res.*, Vol. 22(2), 119-123. (E)

Functionality of silk and its use.

Fonctionnalité de la soie et son utilisation.

HIRABAYASHI K.

1996 *Kogyo Zairyo*, Vol. 44(14), 118-123. (J)

Properties of novel ornament materials boards made from silk fibroin sheets.

Propriétés de nouvelles planches de matériaux ornementales faites à partir de feuilles de fibroïne de soie.

HOSOKAWA J. et al.

1996 *J. Chem. Eng. Jpn*, Vol. 29(6), 1057-1059. (E)

Modification of dyeing properties of silk and sakusan yarn.

Modification des propriétés de teinture de la soie et des fils sakusan.

INOUE H.

1996 *Kyozome to Seiren Senshoku*, Vol. 47(4), 112-118. (J)

Change of performance of tussah silk fabric treated with chitosan by bleaching.

Changements dans les performances des tissus de soie tussah traités avec du chitosan par blanchiment.

KAKO T., KATAYAMA A.

Himeji Junior College, Himeji, Hyogo 6700092, Japan.

1998 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 67(1), 37-41. (J,e)

Color-fastness of bluish-purple pigment from bacteria (*Janthinobacterium lividum*) and its improvement with ultraviolet's absorbents.

Solidité du pigment bleu-pourpre provenant d'une bactérie (*Janthinobacterium lividum*) et son amélioration avec des absorbants d'ultraviolet.

KATO H., HATA T., SHIRATA A., TSUKAMOTO T., YASUI H., HAYASAWA S., KOJIMA A.
1997 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 66(6), 489-492. (J)

Changes in fiber structure of japanese oak silk fibers by the treatment with methacrylamide.

Changements dans la structure des fibres de soie du ver à soie du chêne japonais par traitement au méthacrylamide.

KAWAHARA Y., SHIOYA M.
1997 *J. Macromol. Sci. Phys.*, Vol. B36(4), 503-511. (E)

Silk-wood composites.

Composites bois-soie.

KAWARADA K.
1996 *Toso Kogaku*, Vol. 31(9), 387-391. (J)

Properties of solutions of fibroin mixtures with sodium carboxy methyl cellulose.

Propriétés des solutions de mélanges de fibroïne avec de la carboxy-méthyl-cellulose de sodium.

KHOLMUMINOV A.A., NURGALIEVA F.F., KURINSKIKH L.V., TILLAEV R.S.
1996 *Uzb. Khim. Zh.*, Vol. 3, 49-52. (R)

Drawing-induced structural changes in silk fibroin film after heat treatment and ethanol treatment.

Changements structuraux induits par l'étirage d'un film de fibroïne de soie après traitement thermique et traitement à l'éthanol.

KIM D.K., ITOH T., KOISHI T.
1997 *Sen'i Gakkaishi*, Vol. 53(9), 365-372. (J)

Conformation of the polyalanine repeats in minor ampullate gland silk of the spider *Nephila clavipes*.

Conformation des répétitions de polyalanine dans la soie de la glande ampoulaire mineure de l'araignée *Nephila clavipes*.

LIIVAK O., FLORES A., LEWIS R., JELINSKI L.W.
1997 *Macromolecules*, Vol. 30, 7127-7130. (E)

Characterization of composite membrane of poly(vinyl alcohol) and regenerated silk fibroin for immobilization of horseradish peroxidase and an amperometric nickelocene-mediated sensor sensitive to hydrogen peroxide.

Caractérisation d'une membrane composite de poly(vinyl alcool) et de fibroïne de soie régénérée pour l'immobilisation de la peroxydase de raifort et un détecteur ampérométrique au nickelocène.

LIU H., ZHANG X., ZHANG Z., QI D., FAN Y., LIU Y., LIU S., YU T., DENG J.
1996 *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Vol. 67(1), 77-83. (E)

Immobilization of horse radish peroxydase onto a composite membrane of regenerated silk fibroin and polyvinyl alcohol and its application to a new methylen blue-mediating sensor for hydrogen peroxide.

Immobilisation de la peroxydase de raifort sur une membrane composite de fibroïne de soie régénérée et d'alcool polyvinyl et son application à un nouveau détecteur par bleu de méthylène de peroxyde d'hydrogène.

LIU Y., QIAN J., FU X., LIU H., DENG J., YU T.
1997 *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 21(3), 154-159. (E)

PIXE analysis of silk.

Analyse PIXE de la soie.

LIU Y., YU T., YAO H., YANG F.

1997 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 66(2), 405-408. (E)

Biospinning-low energy and superior spinning (spider).

Basse énergie du filage biologique et filage supérieur (araignée).

MAGOSHI J., MAGOSHI Y., HATA T.

1997 *Sen'i Gakkaishi*, Vol. 53(7), 202-211. (J)

Identification of defects in silk fabrics.

Identification des défauts dans les tissus de soie.

MANNA S.S.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

1998 *Indian Silk*, Vol. 36(11), 27-28. (E)

Regenerated protein fibers. 1/ Research and development of a novel solvent for silk fibroin.

Fibres de protéines régénérées. 1/ Recherche et développement d'un nouveau solvant pour la fibroïne de soie.

MATSUMOTO K., UEJIMA H.

1997 *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.*, Vol. 35(10), 1949-1954. (E)

Regenerated protein fibers. 2/ Viscoelastic behavior of silk protein solutions.

Fibres de protéines régénérées. 2/ Comportement viscoélastique des solutions de protéines de soie.

MATSUMOTO K., UEJIMA H.

1997 *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.*, Vol. 35(10), 1955-1959. (E)

Load-extension characteristics of composite raw silk of *Antheraea yamamai* and *Bombyx mori*.

Caractéristiques d'extension en charge de la soie grège composite d'*Antheraea yamamai* et de *Bombyx mori*.

MATSUMOTO Y.I., SAITO H.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 497-501. (E)

Effects of temperature and humidity on the solubility and degradability of fibroin membrane.

Effets de la température et de l'humidité sur la solubilité et la dégradation de membranes de fibroïne.

MIN S., KAI T., TERAMOTO A., ABE K.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda 386, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 387-392. (E)

Biochemical studies on certain spider's silk.

Etudes biochimiques de certaines soie d'araignée.

PATEL S.K., NIGAM S.

1997 *J. Anim. Morphol. Physiol.*, Vol. 43(1), 51-53. (E)

Effect of hardness of water on degumming of silk.

Effet de la dureté de l'eau sur le décreusage de la soie.

PATHAK S., PRABHU J., SOMASEKHAR T.H.

1996 *Indian J. Fibre Text. Res.*, Vol. 21(4), 283-285. (E)

Structural modifications in bivoltine silk fiber under thermal treatment.

Modifications structurales de la fibre de soie de bivoltins sous traitement thermique.

RAMGOPAL G., RAMANI R., RAMACHANDRA P., RANGANATHAIAH C.

1997 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 63(3), 395-400. (E)

Sorption behavior of flavone and flavonol pigments on silk.

Comportement de sorption des pigments de flavone et de flavonol sur la soie.

SAKATA K., KAWKAMI K., KATAYAMA A.

Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University, 35 Kitahiyoshi-cho, Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto 605, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 369-375. (J,e)

Mordanting mechanism of flavone and flavonol pigments.

Mécanisme de mordantage des pigments de flavonol et de flavone.

SAKATA K., NAGASHIMA N., KATAYAMA A.

Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University, 35 Kitahiyoshi-cho, Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto 605, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 473-476. (J,e)

Determination of the amino acid tryptophan in protein fibers.

Détermination du tryptophane dans les fibres protéiques.

SCHAFER K.

1996 *J. Soc. Dyers Colour.*, Vol. 113(10), 275-280. (E)

The chemistry of spider toxins and spider silk.

La chimie des toxines et de la soie d'araignée.

SCHULZ S.

1997 *Angewandte Chemie (Int. Ed.)*, Vol. 36, 315-326. (E)

Production of bluish-purple pigments by *Janthinobacterium lividum* isolated from the raw silk and dyeing with them.

Production des pigments bleuâtre-violet par *Janthinobacterium lividum* isolé à partir de la soie grège et utilisés en teinture.

SHIRATA A., TSUKAMOTO T., YASUI H., KATO H., HAYASAKA S., KOJIMA A.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1997 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 66(6), 377-385. (J,e)

Effect of physical and chemical modifications on microcrystalline parameters of silk fibers.

Effet des modifications chimiques et physiques sur les paramètres microcristallins des fibres de soie.

SOMASHEKARAPPA H., SELVAKUMAR N., SUBRAMANIAM V., SOMASHEKAR R.

1996 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 59, 1677-1681. (E)

Properties of silk fibroin/poly(vinyl alcohol) blend solutions and peculiar structure found in heterogeneous blend films.

Propriétés des mélanges en solutions de fibroïne de soie et de poly(vinyl alcool) et structure particulière trouvée dans les mélanges de films hétérogènes.

TANAKA T., SUZUKI M., KURANUKI N., TANIGAMI T., YAMAURA K.

1997 *Polym. Int.*, Vol. 42(1), 107-111. (E)

Cholesteric liquid crystalline intermediate in natural silk spinning processes resulting from the chirality of protein secondary structure.

Intermédiaire cristallin liquide cholestérique dans le processus naturel de filage de la soie résultant du pouvoir rotatoire de la structure secondaire de la protéine.

WILLCOX P.J., GIDO S.P.

1996 *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*, Vol. 37(2), 484. (E)

Methylene green-mediated sensor highly sensitive to hydrogen peroxide based on entrapment of horseradish peroxidase in composite membrane of regenerated silk fibroin and poly(vinyl alcohol).

Détecteur au méthylène vert très sensible au peroxyde d'hydrogène basé sur le piègeage de la peroxydase de raifort dans les membranes composites fibroïne de soie régénérée et poly(vinyl alcool).

WU X., LIU H., QI D., LIU Y., QIAN J., LIU S., YU T., DANG J.

1996 *Chin. J. Chem.*, Vol. 14(4), 359-366. (C)

Dose-response characteristics of the fading fabrics dyed with Suou (*Caesalpinia sappan*) due to sun light irradiance and effect of mordants.

Caractéristiques de la réaction aux radiations solaires et aux caustiques de la couleur des tissus teints avec du Suou (*Caesalpinia sappan*).

YOSHIZUMI K., MATSUMOTO M.

1996 *Bunkazai Hozon Shufuku Gakkaishi*, Vol. 40, 63-71. (J)

On antimicrobial and conductive silk fibers.

Les fibres de soie conductrices et antimicrobienne.

YU Z., YANG B., CHEN W., LING R.

1997 *Zhejiang Sichou Gonxueyan Xuebao*, Vol. 14(1), 12-16. (C)

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**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

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

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

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

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

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

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

- Remerciements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

* * *