

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (France)
BECK D. (France)
BOSQUET G. (France)
CROIZIER G. (France)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DATTA R.K. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FONCHE J. (France)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
HORIE Y. (Japon / *Japan*)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
LIU S.-X. (Chine / *China*)
LU H.-S. (Chine / *China*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
PERSOONS C.J. (Pays-Bas / *The Netherlands*)
PRUDHOMME J.-C. (France)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SHIRATA A. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TAKAHASHI R. (Brésil / *Brazil*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J.-G. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YANAGAWA H. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE - CONTENTS

Editorial	i
Actualités et points de vue / News and views	iii
Revue / Reviews	
A review of tissue culture studies in mulberry (<i>Morus</i>)	1
Les cultures de tissu chez le mûrier (<i>Morus</i>)	21
A. K. WAKHLU & B. SINGH BHAI	
Photosynthesis for crop improvement in mulberry (<i>Morus</i> spp.) - a review	27
Revue sur le rôle de la photosynthèse dans l'amélioration de la récolte chez le mûrier (<i>Morus</i> spp.)	57
B. K. SINGHAL, S. CHAKRABORTI, MALA V. RAJAN, A. SARKAR & R. K. DATTA	
Articles scientifiques / Scientific papers	
Study on the cocoon colour segregation manifested in hybrids between uni-bivoltine and multivoltine silkworm, <i>Bombyx mori</i> L. races	67
La ségrégation de la couleur des cocons chez des hybrides entre vers à soie (<i>Bombyx mori</i>) mono-bivoltins et polyvoltins	75
P. TZENOV, Y. NACHEVA & N. PETKOV	
Effect of tender shoot feeding on silk technological parameters of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	79
Effet de l'alimentation du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L. avec des pousses tendres sur les paramètres technologiques de la soie	91
N. MAHESHKUMAR VAGE & J. ASHOKA	
Studies on pollen morphology and pollen germination in mulberry (<i>Morus</i> sp.)	97
Etudes sur la morphologie et la germination du pollen chez le mûrier (<i>Morus</i> sp.)	105
P. K. TEWARY, R. BALAKRISHNA, V. KUMAR & A. SARKAR	
Antagonistic effect of <i>Trichoderma</i> and <i>Gliocladium virens</i> on two foliar pathogens of mulberry	109
Effet antagoniste de <i>Trichoderma</i> et de <i>Gliocladium virens</i> vis à vis de deux pathogènes foliaires du mûrier	117
T. PHILIP, D. D. SHARMA & H. R. SHIVAPRATAP	
Symptomatological observations on manganese deficiency in mulberry (<i>Morus indica</i> L. variety M5)	123
Observations des symptômes engendrés par une carence en manganèse chez le mûrier (<i>Morus indica</i> L., variété M5)	131
M. S. MANJUNATH, U.D. BONGALE & S. B. DANDIN	

Rapports techniques / Technical reports

Effect of moulting hormone on the larval growth, cocoon characters and silk quality of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	135
Effet de l'hormone de mue sur la croissance larvaire, les caractères du cocon et la qualité de la soie du ver à soie, <i>Bombyx mori</i> L.	145
MIAO YUNGEN	
Evolution of new productive bivoltine hybrids CSR₂ × CSR₄ and CSR₂ × CSR₅ . . .	151
Mise au point de nouveaux hybrides bivoltins productifs CSR ₂ × CSR ₄ et CSR ₂ × CSR ₅ .	169
R. K. DATTA, H. K. BASAVARAJA, N. MAL REDDY, S. NIRMAL KUMAR., M. M. AHSAN, N. SURESH KUMAR & M. RAMESH BABU	
Effect of plant density on growth, yield and leaf quality in triploid mulberry	175
Effet de la densité de plantation sur la croissance, le rendement et la qualité de la feuille chez le mûrier triploïde	181
S. G. DOSS, K. VIJAYAN, M. S. RAHMAN, K. K. DAS, S. P. CHAKRABORTI & B. N. ROY	

EDITORIAL

Nous avons tenté par le passé, d'ouvrir dans *Sericologia* une rubrique destinée à recueillir des informations et des points de vue. L'objectif était de faire connaître aux lecteurs du journal les événements, les projets et les évolutions relatifs à la sériciculture, qu'ils soient d'ordre technique, scientifique, économique ou historique. Il s'agissait également de recueillir des points de vue scientifiques sur différents résultats obtenus ou différentes méthodes utilisées dans les travaux qui sont présentés dans *Sericologia*.

La première tentative n'a pas été couronnée de succès. Cependant, divers lecteurs et certains délégués présents lors du XVIIIème Congrès qui s'est tenu au Caire en 1999, ont fait part de leur souhait de voir apparaître ce type d'informations dans *Sericologia*.

C'est pourquoi nous proposons, dans ce premier numéro de l'année 2000, l'ouverture de la rubrique "Actualités et Points de vue" dont l'objectif est de délivrer des informations sur les événements et les nouveautés, comme dans un magazine et également d'ouvrir un forum de discussions sur divers éléments d'ordre technique, scientifique ou économique.

Les textes qui seront soumis pour cette rubrique devront être assez courts et seront sélectionnés par la rédaction.

La rubrique « Actualités et Points de vue » s'ouvre donc aujourd'hui avec un commentaire du Professeur J. M. Legay.

Gérard Chavancy
Rédacteur en Chef

EDITORIAL

We tried to open a column in our journal for collecting information and opinions in the past. The aim was to advertise the events, the projects and the evolutions in the field of sericulture, either of a technical, scientific, economical or historical nature to the journal readers. It consisted also in collecting scientific opinions on different results obtained or different methods used in the works presented in *Sericologia*.

The first attempt was not crowned with success. However, various readers and some delegates present at the XVIIIth Congress which took place in Cairo in 1999 wish to see this type of information appear in *Sericologia*.

That is why we are proposing, in this first issue of the year 2000, to open the column 'News and Views' which aims at delivering information on events and novelties, like in a magazine and also to open a talk forum on different elements of a technical, scientific or economical nature.

The texts which will be submitted in this column will have to be quite short and will be selected by the editorial board.

The column 'News and views' opens therefore today with a comment from Professor J. M. Legay.

Gérard Chavancy
Chief Editor

ACTUALITES ET OPINIONS

A PROPOS DE L'HERITABILITE DES CARACTERES QUANTITATIFS CHEZ LE VER A SOIE

JEAN-MARIE LEGAY¹

1. UMR CNRS 5558 'Biométrie et Biologie Evolutive' - Université Claude Bernard - Lyon 1 -
43 Bd du 11 Novembre 1918 - 69622 Villeurbanne cedex.

En génétique quantitative (qui concerne la plupart des caractères d'intérêt pratique et économique chez les animaux domestiques et les plantes cultivées), on a très tôt été intéressé par l'analyse de la variation constatée d'un caractère dans une population donnée et dans une génération donnée. La question essentielle était : quelle est la part dans cette variation constatée (donc phénotypique) des facteurs génétiques et quelle est celle des facteurs environnementaux.

On a vite admis dans les milieux scientifiques qu'il y avait *toujours* une part génétique et une part environnementale, même si l'une des deux était parfois petite. On a admis aussi que ces parts étaient *additives*, même si des équations plus élaborées ont été proposées plus tard, et on a écrit :

$$\sigma_p^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2 \quad (1)$$

Cette équation fondamentale représente à elle seule toute une théorie, tout un état d'esprit, si ce n'est une philosophie ; elle domine de nombreux chapitres de la Biologie (en particulier de la génétique et de l'Evolution), mais aussi des chapitres de la Psychologie, de la Sociologie, de la Pédagogie (en particulier quand il s'agit par conséquent de populations humaines). On comprend donc que l'équation (1) ait été très discutée.

En outre si l'on est capable d'effectuer la décomposition selon l'équation (1) de la variance phénotypique, alors, pour un certain caractère mesurable précis, on peut définir et calculer un indice tel que :

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_p^2} \quad (2)$$

qu'on appelle *héritabilité* de ce caractère (Lush, 1937). Cet indice est évidemment populationnel ; il est valable pour le caractère concerné, dans une population donnée et une génération donnée. Il est théoriquement très commode puisqu'il varie entre 0 et 1 (puisque σ_G^2 est toujours $< \sigma_p^2$ d'après (1) ; et il relie les efforts de sélection ΔS aux gains qu'on peut en espérer ΔG . Très schématiquement, on s'attend à ce que :

$$\Delta G = h^2 \cdot \Delta S \quad (3)$$

Plus l'héritabilité est forte, plus les progrès de la sélection seront rapides. C'est une des raisons de l'intérêt qu'on porte à l'héritabilité que de pouvoir en principe prévoir le déroulement d'une sélection, et en particulier prévoir son coût, sa durée, pour un objectif donné.

Malheureusement, malgré un point de départ apparemment logique et simple, les problèmes se révèlent très nombreux, comme cela fut souligné depuis longtemps (Waddington, 1957). Finalement l'héritabilité est un indice très sensible aux conditions dans lesquelles on l'établit.

Il y a d'abord les problèmes liés à sa définition : l'existence d'une héritabilité au sens large avec toutes les questions de variance non additive, liés aux phénomènes de dominance et d'épistasie et aux interactions entre génotype et environnement (Kempthorne, 1957). C'est pourquoi certains auteurs font davantage confiance à l'héritabilité réalisée, dont la définition, très différente, est d'origine expérimentale : elle n'implique pas la satisfaction d'hypothèses sur la structure génétique.

D'autre part il y a les problèmes liés à l'estimation effective de h^2 . Les biologistes ont fait preuve de beaucoup d'imagination dans ce domaine et ont proposé de très nombreuses méthodes : utilisation des régressions, corrélations, analyses de la variance, utilisation de situations particulières (jumeaux, symétries droite / gauche, etc...). On retiendra que si la définition de l'héritabilité est valable pour une génération donnée, son estimation implique la plupart du temps la maîtrise de deux générations (même si les mesures ne sont faites que dans une génération) : ainsi pour pratiquer une analyse de la variance, il faut organiser les croisements à la génération précédente. D'une façon générale, on met en oeuvre une parenté qui conduit à des corrélations théoriques que l'on compare à des corrélations observées, car la différence ne peut être attribuée qu'aux effets de l'environnement.

Enfin il y a les problèmes liés au choix des populations et à l'échantillonnage des individus représentatifs de ces populations. Car l'héritabilité se révèle, quelles que soient les précautions prises, un indice très sensible. Pour un même caractère, sur quelle espèce travaille-t-on ? sur quelle variété ? Quelle était la taille de l'échantillon ? Comment les individus étaient-ils choisis (voir par exemple Legay, 1962) ? Enfin quelle était la position de la population dans le déroulement d'une sélection : était-ce le début ou la fin d'un tel travail ? La pression de sélection était-elle forte sur le caractère étudié, ou sur un caractère voisin ?

Si j'ai brièvement passé en revue les difficultés d'estimation de l'héritabilité, c'est que récemment deux articles parus dans *Sericologia* (Singh *et al.*, 1998 et Lea, 1998) constituent l'occasion de s'interroger sur les modalités de l'estimation de l'héritabilité et sur son usage.

En effet, ces articles ne me paraissent pas tenir compte de toutes les causes de variations possibles et proposent des valeurs pour l'héritabilité dont je crois qu'elles sont trop élevées. Si le poids de la coque soyeuse avait une héritabilité de 0,80, alors la sélection de ce caractère économique très important serait efficace et rapide. Or ce n'est pas le cas. Tous les sélectionneurs savent bien que l'on butte sur des poids de soie de l'ordre de 300 mg, quantité que l'on a beaucoup de mal à dépasser. Il a fallu s'adresser à des hybrides hétérotiques pour obtenir des races à forte richesse soyeuse, c'est à dire mettre en oeuvre des mécanismes très différents de la sélection classique. Sinon on constate que l'héritabilité diminue à mesure que le niveau de sélection augmente. Si la réserve de variabilité génétique s'épuisait, l'héritabilité tendrait vers zéro.

Ainsi donc l'héritabilité n'a pas une valeur absolue, précise et stable. Elle n'est pas seulement relative à toutes les caractéristiques que nous avons rappelées, mais aussi à un état du génome dépendant lui-même de la sélection qui a précédé.

De ce fait, l'héritabilité ne peut jouer un rôle de prédiction de façon aussi simple qu'on aurait pu l'imaginer. Par contre, elle peut devenir un bon indice de comparaison entre deux souches, entre deux variétés, entre deux étapes de sélection. L'important dans la comparaison de deux populations A et B ce n'est pas que : $h_A^2 = 0,60$ et $h_B^2 = 0,40$ c'est que $h_A^2 > h_B^2$.

Etant donné la sensibilité de h^2 à de nombreux facteurs et la commodité du ver à soie comme matériel de recherche, il me semble que cet insecte pourrait permettre plusieurs types de travaux.

Les uns pourraient étudier la stabilité de h^2 sous certaines conditions et sa variation en fonction des modifications d'un certain facteur de l'environnement.

Dans le même ordre d'idées, on pourrait reprendre l'historique des estimations de h^2 . Les plus anciennes chez le ver à soie semblent être celles de Tsuchiya (1956) et de Saïo (1959). Comment les valeurs trouvées pour h^2 ont-elles évolué et pourquoi?

D'autres études pourraient essayer de prendre en compte simultanément deux (ou plusieurs) caractères et tenter d'estimer l'héritabilité d'une combinaison de ces caractères (théoriquement et pratiquement) ; par exemple si pour les trois caractères X, Y, Z on a :

$$Z = X + Y$$

On ne peut en déduire que $h_Z^2 = h_X^2 + h_Y^2$. Par contre on peut se poser des questions intéressantes telles que : y a-t-il une combinaison de X et Y (par exemple $Z = aX + bY$) qui permette de maximiser h_Z^2 ? (Legay et Mourgues, 1966).

REFERENCES

- KEMPTHORNE O., 1957, An introduction to genetics statistics, John Wiley ed., New York.
- LEA H. Z., 1998, Combining ability and heritability estimation for Sri Lanka stocks of mulberry silkworm *Bombyx mori*, *Sericologia*, 38,3, 425-431.
- LEGAY J.-M., 1962, Problèmes posés par l'estimation de l'héritabilité de quelques caractères quantitatifs chez *Bombyx mori*, *Annales de Génétique*, 4,2, 67-72.
- LEGAY J.-M. & MOURGUES C., 1966, Du rôle de l'héritabilité maximale d'un ensemble de caractères dans l'évolution de ces caractères, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 262, 1979-1981.
- LUSH J.-L., 1937, Animal breeding plans, Iowa State University Press
- SAIO K., 1959, Taux de sélection chez une population F2 de ver à soie. Application de l'héritabilité et des corrélations génétiques, *Jap. J. Breedg.*, 8, 4, 223-226.
- SINGH T., CHANDRASEKHARAI AH & SAMSON M. V., 1998, Correlation and heritability analysis in the silkworm *Bombyx mori*, *Sericologia*, 38, 1, 1-13.
- TSUCHIYA S. & KURASHIMA H., 1956, Study on the heritability of the measurable characters in *Bombyx mori* L. Heritability in the weight of the cocoon shell, *J. Seric. Sci. Jpn.*, 26, 84-88.
- WADDINGTON CH., 1957, The strategy of genes, George Allen and Unwin ed., London.

NEWS AND VIEWS

HERITABILITY OF QUANTITATIVE CHARACTERS IN SILKWORM

JEAN-MARIE LEGAY¹

1. UMR CNRS 5558 "Biométrie et Biologie Evolutive" - Université Claude Bernard - Lyon I -
43 Bd du 11 Novembre 1918 - 69622 Villeurbanne cedex.

In quantitative genetics (which regards most characters of a practical and economical interest in domestic animals and crops) some interest has been granted very early to the analysis of the noted variation of a character in a given population and in a given generation. The main question was: what is the part in this noted variation (and therefore phenotypic) of the genetic factors and of the environmental factors?

It was soon admitted among scientists, that there was *always* a genetic influence and an environmental influence even if one of the two was sometimes smaller. It was also admitted that these influences were *additive*, even if more complex equations were proposed later and the following was written:

$$\sigma_p^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2 \quad (1)$$

This basic equation represents on its own a whole theory, a whole frame of mind, if not a philosophy; it controls numerous chapters of Biology (in particular of Genetics and of Evolution) but also chapters of Psychology, Sociology, Education (particularly when human populations are concerned). It is therefore understandable that the equation (1) was discussed a lot.

Besides, if one is able to deduct the phenotypic variance from the equation (1), therefore, for one precise and measurable character, an index can be defined and calculated such as

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_p^2} \quad (2)$$

which is called *heritability* of this character (Lush, 1937). This index is obviously populational; it is valid for the character concerned, in a given population and a given generation. Theoretically it is very convenient since it varies between 0 and 1 {since σ_G^2 is always $< \sigma_p^2$ according to (1)}; and it links the selection efforts ΔS to the gains one can hope at ΔG . Very schematically, it can be expected that:

$$\Delta G = h^2 \cdot \Delta S \quad (3)$$

The stronger the heritability, the quicker will the selection progress. This is one of the reasons why heritability has an interest because in principle it can plan the progress of a selection and particularly its cost, its duration for a given purpose.

Unfortunately, despite an apparently logical and simple starting point, problems are numerous, as it was stressed a long time ago (Waddington, 1957). In fact, heritability is a very sensitive index to the conditions in which it is established.

Definition is the first problem : the existence of an heritability widely speaking with all the questions regarding non additive variance, linked to dominance and epistasis phenomena and to the interactions between the genotype and the environment (Kempthorne, 1957). That is why some authors give more credit to the *realized heritability*, whose definition, is very different and has an experimental origin: it does not imply the satisfaction of hypothesis on the genetic structure.

On the other hand there are problems linked to the effective estimation of h^2 . Biologists showed a lot of imagination in this field and proposed numerous methods: use of regressions, correlations, variance analysis, use of particular situations (twins, right/left symmetries, etc.).

We will retain that if the definition of heritability is valid for a given generation, its estimation involves most of the time the control of two generations (even if the measures are only made in one generation) therefore in order to carry out a variance analysis, the crosses need to be carried out in the previous generation. Generally, a kinship is implemented which leads to theoretical correlations which are compared to observed correlations, because the difference can only be attributed to the environmental effects.

Finally, the problems linked to the choice of populations and to the sampling of representative individuals of these populations exist. Because heritability is, whatever the precautions taken, a very sensitive index. For a same character, which species to work on? which variety? What was the size of the sample? How were the individuals chosen (see for example Legay, 1962)? Finally, what was the position of the population in the processing of a selection: was it the beginning or the end of such a work? Was the pressure of the selection strong on the character studied, or on a close character?

If I briefly reviewed the difficulties in estimating heritability, it is because two articles recently published in *Sericologia* (Singh et coll., 1998 and Lea, 1998) present the opportunity to query the modes of estimating heritability and its use.

Indeed, it seems to me that these articles did not take into account all the causes of possible variations, and proposed heritability values which I think were too high. If the silk shell weight had an heritability of 0.80 then the selection of this very important economical character would be efficient and quick. However, it was not the case. All the breeders know that the silk weights are of around 300 mg, and it is difficult to exceed this quantity. It was necessary to use heterotic hybrids in order to obtain races with a high silk ratio, which means that mechanisms very different from classical selection have been involved.

If not, it is noticed that the heritability decreases while the level of selection increases. If the amount of genetic variability ran out, heritability would tend towards zero.

Therefore heritability *does not have an absolute, precise and stable value*. It is not only connected to all the characteristics which we reminded but also to the state of the genome which depends itself on the selection which occurred before.

For this reason, heritability cannot have a role of prediction as easily as one could have imagined. However, it can become a good comparison index between two strains, between two varieties, between two selection steps. The main thing in the comparison of two populations A and B is not that $h_A^2 = 0.60$ and $h_B^2 = 0.40$ it is that $h_A^2 > h_B^2$.

Given the sensitivity of h^2 to numerous factors and the convenience of the silkworm as a research material, it seems to me that this insect could enable several types of studies.

Some could study the stability of h^2 under certain conditions and its variation depending on the modifications of one particular environmental factor.

By the same token, the history of h^2 estimations could be studied again. For the silkworm, the oldest seem to be the ones of Tsuchiya (1956) and of Saio (1959). How did the values found for h^2 evolve and why?

Other studies could try to take simultaneously into account two (or several) characters and try to estimate the heritability of a combination of these characters (theoretically and practically) for example if for three characters X, Y, Z one has:

$$Z = X + Y$$

It cannot be deducted that $h_Z^2 = h_X^2 + h_Y^2$. However interesting questions can be asked such as: is there a combination of X and Y (for example $Z = aX + bY$) which can allow to maximise h_Z^2 ? (Legay and Mourgues, 1966).

A REVIEW OF TISSUE CULTURE STUDIES IN MULBERRY (*MORUS*)

A.K. WAKHLU & B. SINGH BHAAU*

Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Botany, University of Jammu, Jammu - 180 006, India.

Mulberry is an important plant in sericulture industry. For the last three decades considerable work has been done on tissue culture of this plant. These studies have focused attention on micropropagation, organogenesis, somatic embryogenesis, synthetic seeds, haploid production, cryopreservation, protoplast culture and genetic engineering. This review comprises work dealing with mulberry biotechnology.

Keywords: *Morus*, mulberry, tissue culture, micropropagation, organogenesis, callus, cryopreservation, somatic embryogenesis, haploids, protoplast culture, synthetic seeds, genetic transformation.

ABBREVIATIONS

MS: Murashige and Skoog (1962), **AE**: Von-Arnold and Eriksson (1981), **WPM**: Woody Plant Medium (Lloyd and McCown, 1980), **B5**: Gamborg *et al.*, (1968), **LS**: Linsmaier and Skoog (1965), **Knop** - Knop (1884), Snir medium (Snir, 1982), **MB**: Modified Bourgin (Qian *et al.*, 1982), **White** - White (1963).

GROWTH REGULATORS

NAA: α naphthaleneacetic acid, **IAA**: Indole-3-acetic acid, **IBA**: Indole-3-butyric acid, **2,4-D**: dichlorophenoxy acetic acid, **BAP**, 6-benzylaminopurine, **Kn**: kinetin, **Z**: Zeatin, **2-ip 6**: (YY-dimethylamino), Purine **GA₃**-Gibberelic acid, **2,4,5,T**- 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid, **4PU-N**-(2 Chloro-4-pyridyl)-N-Phenylurea, **TDZ**: Thiadizuran, **CM**-coconut milk, **IPA**-indole-3-propanic acid.

INTRODUCTION

The genus *Morus* belonging to the family Moraceae comprises nearly 65 species in the tropic and sub-tropic belt (Ramesh and Basavaiah, 1989). Many varieties of these species are cultivated on a commercial scale in China, Japan, Korea, Former USSR and India for the sericulture industry (Oka and Ohyama, 1986). Approximately 80 research publications in English have so far appeared on tissue culture of 12 species of this genus. These investigations have focused attention towards the establishment of protocols for: i) micropropagation of specific genotypes, ii) production of haploid

* Laboratory of Cellular & Molecular Cytogenetics, Department of Botany, Delhi University, Delhi - 110 007, India

Table 1. Summary of tissue culture work on mulberry.(1)

Tableau 1. Résumé du travail sur la culture de tissus chez le mûrier.(1)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source de l'explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	Référence
<i>Morus alba</i>	-	Cambial region of young twigs <i>Région cambiale de jeunes rameaux</i>	1) MS	1) 2, 4-D (0.06)	Callus / <i>Cal</i>	Narasimhan <i>et al.</i> , (1970)
<i>Morus alba</i>	Kenmochi, Yoso and Ichinose	Roots, hypocotyls Isolated buds <i>Racines, hypocotyles Bourgeons isolés</i>	1) MS 3) + 4) MS	1) 2, 4-D (1.0), IAA (1.0), NAA (1.0), 3) Kn (0.1) NAA (1.0)	Callus / <i>Cal</i> Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Ohyama (1970)
<i>Morus alba</i>	-	Young twigs <i>Jeunes rameaux</i>	1) MS	1) IAA, NAA, IPA, 2, 4-D, 2, 4, 5-T, GA ₃ (1 ppm)	Rooting from callus <i>Racinement à partir du cal</i>	Ghugale <i>et al.</i> , (1971)
<i>Morus alba</i>	Ichinose	Stem segments Segments de tige	1) MS	1) 2, 4-D, IAA, IBA, Kn, BAP	Callus / <i>Cal</i>	Oka and Ohyama (1973)
<i>Morus alba</i>	Kenmochi	Winter buds <i>Bourgeons d'hiver</i>	1) + 2) MS	1) + 2) BAP (1)	Shoot formation <i>Formation de pousses</i>	Oka and Ohyama (1974)
<i>Morus alba</i>	Kenmochi Ichinose	Axillary buds <i>Bourgeons axillaires</i>	3) MS	3) NAA (10 ⁻⁶ M) BA (10 ⁻⁶ M)	Shoot formation <i>Formation de pousses</i>	Ohyama and Oka (1975)
<i>Morus alba</i>	-	Shoot tips <i>Sommets des pousses</i>	3) + 4) MS	3) BA, GA ₃ 4) NAA (1.0)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Ohyama and Oka (1976)

Table 1. Summary of tissue culture work on mulberry. (2)

Tableau 1. Résumé du travail sur la culture de tissus chez le mûrier. (2)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	Référence
<i>Morus alba</i>	-	Young stem pieces <i>Morceaux de jeunes tiges</i>	1) MS	1) BA (10 ⁻⁵ M), NAA (10 ⁻⁵ M), 2, 4-D (10 ⁻³ M)	Callus/ <i>Cal</i>	Oka and Ohyama (1976)
<i>Morus alba</i>	-	Buds/ <i>Bourgeons</i>	3) SDS	3) BA (1.0)	Shoot formation <i>Formation de pousses</i>	Oka and Ohyama (1978)
<i>Morus alba</i>	Yanagiba, kenmochi	Winter buds, juvenile leaves/ <i>bourgeons</i> <i>d'hiver, feuilles juvéniles</i>	2) + 4) MS	2) BA (1-10) 4) NAA (0.1)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Oka and Ohyama (1981)
<i>Morus alba</i>	-	Hypocotyls, cotyledons, epicotyls	2) MS	2) BA (10.0), 4 PU (10) NAA (1.0)	Shoot formation <i>Formation de pousses</i>	Ohyama and Oka (1982)
<i>Morus alba</i>	-	Mature embryos, cotyledons, leaves <i>Embryons matures</i> <i>cotylédons, feuilles</i>	2) + 3) MS & AE 4) MS	2) + 3) BA (1.0-5.0), NAA (0.001 - 0.1) 4) IBA (0.1-5)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Kim <i>et al.</i> , (1985)
<i>Morus alba</i>	S1	Leaves / <i>Feuilles</i>	1) MS Salts + B ₅ vit	1) BAP (2.0), 2, 4-D (0.5)	Callus/ <i>Cal</i>	Tewary <i>et al.</i> , (1989)
<i>Morus alba</i>	S1	Internodal segments <i>Segments internodaux</i>	1) + 2) + 4) MS	1) 2, 4-D (1.0), BAP (0.5), NAA (0.5) 2), BAP (2.0) 4) NAA (0.5) + BAP (1.0)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Narayan <i>et al.</i> , (1989)

Table 1. Summary of tissue culture work on mulberry.(3)

Tableau 1. Résumé du travail sur la culture des tissus chez le mûrier.(3)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source de l'explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	
<i>Morus alba</i>		Nodal segments <i>Segments nodaux</i>	3) + 4) MS	3) BA (2.5 µm)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Sharma and Thorpe (1990)
<i>Morus alba</i>	S1	Shoot apices <i>Sommets des pousses</i>	1) + 2) + 4) MS	1) + 2) NAA (0.7 + 2), BA (2.0) 4) NAA (1.0)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Tewary and Rao (1990)
<i>Morus alba</i>	Mandalaya	Axillary buds <i>Bourgeons axillaires</i>	3) MS 4) 1/2 MS salts	3) BAP (13.3 µM), NAA (5.4 µM) 4) IAA (5.7 µM)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Chattopadhyay & Datta (1990)
<i>Morus alba</i>	Mandalaya	Axillary buds <i>Bourgeons axillaires</i>	3) MS 4) 1/2 MS salts	3) BAP (2.0), IAA (1.0) 4) NAA (1.0 & 2.0)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Chattopadhyay <i>et al.</i> , (1990)
<i>Morus alba</i>		Incapstulated adventitious buds <i>Bourgeons adventifs encapsulés</i>	MS	BA (1.0)	In vitro growth <i>Croissance in vitro</i>	Machii (1992a)
<i>Morus alba</i>		Immature leaves <i>Feuilles immatures</i>	MS & B5	BA, NAA	Callus formation <i>Formation de cal</i>	Machii (1992b)
<i>Morus alba</i>	S1	<i>In vitro</i> leaves, callus raised from stem & leaves <i>Feuilles in vitro, cal obtenu à partir de la tige et des feuilles</i>				Tewary and Lakshmisita (1992)

Table I. Summary of tissue culture work on mulberry. (4)

Tableau I. Résumé du travail sur la culture des tissus chez le mûrier. (4)

Species	Variety /Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	
<i>Morus alba</i>	K2	<i>In vivo</i> leaves, callus raised from hypocotyl and cotyledon explants <i>Feuilles in vivo</i> <i>Cal obtenu d'hypocotyle et explants du cotyledon</i>	8) MS + ½ MS micro-elements	8) 2, 4-D (2 mg l ⁻¹), BAP (0.1 - 0.5)	Protoplast division <i>Division du protoplaste</i>	Tewary and Lakshmisita (1992)
	K2, S799	Germinating seedling <i>Plantule en germination</i>				
<i>Morus sp</i>	10 hybrids <i>10 hybrides</i>	Axillary buds <i>Bourgeons axillaires</i>	3) MS	3) BAP (1.0) 4) NAA (0.5)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Raghunath <i>et al.</i> , (1992)
<i>Morus alba</i>	Ichinose	Leaves / <i>Feuilles</i>	2) MS	2) BAP (2.0)	Adventitious buds <i>Bourgeons adventifs</i>	Katagiri and Thin (1994)
<i>Morus alba</i>	S1	Nodal explants <i>Explants nodaux</i>	3) MS 4) ½ MS	3) BAP (2.0) 4) IBA (0.1)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Islam <i>et al.</i> , (1994)
<i>Morus alba</i>	S1	Apical buds <i>Bourgeons apicaux</i>	3) MS	3) BA (8.8 µM), Colchicine (0-0.2 %)	Tetraploid plants <i>Plantes tétraploïdes</i>	Chakraborti <i>et al.</i> , (1998)
<i>Morus alba</i>	MR2	Hypocotyl segments <i>Segments de l'hypocotyle</i>	1) MS & LS 2) LS 4) LS	1) IAA (0.5), BA (0.5) 2) NAA (0.5), IBA (0.75) 4) IBA (0.75)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Kathiravan <i>et al.</i> , (1995)

Table 1. Summary of tissue culture work on mulberry.(5)

Tableau 1 Résumé du travail sur la culture des tissus chez le mûrier.(5)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source de l'explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morpho-génétique	Référence
<i>Morus alba</i>	MR2	Hypocotyl derived callus <i>Cal dérivé de l'hypocotyle</i>	1) MS 2) Liquid MS 5) Liquid MS	1) 2, 4-D (1.0), BAP (0.5) 1) 2, 4-D (0.1-1.0) 5) 2, 4-D (0.5)	Heart shaped embryo like structures <i>Embryon en forme de cœur</i>	Shajahan <i>et al.</i> , (1995)
<i>Morus alba</i>		Shoot tips <i>Sommets des pousses</i>	2) Liquid MS 4) MS	2) 4 PU (2.0) 2) BA (1.0) 4) NAA (0.01)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Hayashi and Oka (1995)
<i>Morus alba</i>	V1, S34	Apical shoot buds <i>Bourgeons apicaux des pousses</i>	3) MS 4) MS	3) BA (2.0), NAA (0.1) IBA (1.0)	Plants in soil <i>Plantes dans le sol</i>	Tewary <i>et al.</i> , (1995)
<i>Morus alba</i>	White	Nodal segments <i>Segments nodaux</i>	3) MS 4) ½ MS	3) BAP (2.0), IAA (0.5) 4) IBA (0.5)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Verma <i>et al.</i> , (1996)
<i>Morus alba</i>	MR2	Hypocotyls, young leaves, petioles <i>Hypocotyles, feuilles jeunes, pétioles</i>	1) MS 2) LS 4) MS	1) 2, 4-D (1.5), BAP (0.5) 2) NAA (0.5), BAP (0.75) 4) IBA (0.5)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Kathiravan <i>et al.</i> , (1997)
<i>Morus sp</i>	Indica 21 Lembang	Embryo's at different developmental stages. <i>Embryon à différents stades de développement</i>	5) MS Salts + B5 vit	5) TDZ (1.0)	Embryoids <i>Embryoides</i>	Thinh and Katagiri (1995)
<i>M. indica</i>	Lembang	Stem segments, leaves, petioles <i>Segments de la tige, feuilles, pétioles</i>	1) MS	1) 2, 4-D, IAA, IBA, NAA (0.5-2.0)	Plants in soil <i>Plantes dans le sol</i>	Patel <i>et al.</i> , (1983)

Table I. Summary of tissue culture work on mulberry. (6)

Tableau I. Résumé du travail sur la culture de tissus chez le mûrier. (6)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	
<i>Morus indica</i>	-	Axillary buds <i>Bourgeons axillaires</i>	3) MS	3) IBA, 2, 4-D, NAA (0.5) 3) + 4) Kn (1), NAA (0.5)		Patel <i>et al.</i> , (1983)
<i>Morus indica</i>	-	Axillary buds, excised leaves, stem segments / <i>Bourgeons</i> <i>axillaires, feuilles</i> <i>excisées, tige</i>	4) MS 1) MS	1) 2, 4-D (2.0), M (10 %)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Mhatre <i>et al.</i> , (1985)
<i>Morus indica</i>	-	Encapsulated buds <i>Bourgeons encapsulés</i>	3) MS	3) BAP (2.0)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Bapat <i>et al.</i> , (1987)
<i>Morus indica</i>	-	Encapsulated buds <i>Bourgeons encapsulés</i>	-	-	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Bapat and Rao, (1990a)
<i>Morus indica</i>	-	Encapsulated buds <i>Bourgeons encapsulés</i>	-	-	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Bapat and Rao, (1990b)
<i>Morus indica</i>	-	Ovary / <i>Ovaire</i>	7) MS		Gynogenic plants in soil / <i>Plantes</i> <i>gynogéniques dans</i> <i>le sol</i>	Sita <i>et al.</i> , (1991)
<i>Morus indica</i>	-	Axillary buds <i>Bourgeons axillaires</i>	MS	-	Plantlet in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Pattanaik <i>et al.</i> , (1995)
<i>Morus indica</i>	S135	Anthers / <i>Anthères</i>	6) MB	1) NAA (0.5), BA (1.0) 6) NAA (0.5), IBA (0.5), 2, 4-D (0.5)	Embryoids <i>Embryoides</i>	Jain <i>et al.</i> , (1996)

Table 1. Summary of tissue culture work on mulberry.(7)

Tableau 1. Résumé du travail sur la culture des tissus chez le mûrier.(7)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source de l'explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	
<i>Morus indica</i>	S 13	Internodal segments, young expanding leaves / Segments internodaux, jeunes feuilles en croissance	1) MS, L.S, WPM 2) MS 4) ½ MS	1) 2, 4-D (2.0), BA (0.5) 2) BA (1.0) 4) IBA (1.0)	Plants in soil <i>Plantes dans le sol</i>	Sahoo <i>et al.</i> , (1997)
<i>Morus nigra</i>	-	Dormant buds <i>Bourgeons dormants</i>	-	BA	Shoots with inflorescence <i>Pousses avec inflorescence</i>	Angrish <i>et al.</i> , (1986)
<i>Morus nigra</i>	-	Shoot tips <i>Sommets des pousses</i>	3) Snirs medium Knop's macro and MS micro 4) MS	3) BA (0.5) 4) IBA (0.5)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Ivanicka (1987)
<i>Morus nigra</i>	-	Shoot tips, nodal explants / <i>Sommets des pousses, explants nodaux</i>	3) + 4) MS	3) BAP (1.0) 4) IBA (0.25)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Yadav <i>et al.</i> , (1990)
<i>Morus acidosa</i>	M-32, Yakushima Inoda, Hoshino, Ichinose, Shimaguwa, and 20 strains of foreign varieties / et 20 souches de variétés étrangères	Axillary & apical buds <i>Bourgeons axillaires & apicaux</i>	3) + 4) MS	3) BA (1.0)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Enomoto (1987)

Table 1. Summary of tissue culture work on mulberry. (8)
 Tableau 1. Résumé du travail sur la culture des tissus chez le mûrier. (8)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source de l'explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	Référence
<i>Morus australis</i>	-	Binucleate pollen <i>Pollen binucléé</i>	1) ¼ B5 6) Modified B5 MS liquid medium <i>Milieu liquide B5 MS modifié</i>	1) IBA (1.0), BA (1.0) 6) BA (1.0), IBA (0.5)	Embryoid like structures <i>Structures ressemblant à des embryons</i>	Katagiri and Modala (1993)
<i>Morus australis</i>	M32	Torpedo to cotyledonary stage embryos <i>Embryons du stade de torpille au stade de cotylédon</i>	5) MS salts + B5 Vit	5) TDZ (0.5 - 10)	Embryoids <i>Embryoïdes</i>	Katagiri and Thinh (1995)
<i>Morus australis</i> syn <i>M. acidosa</i>	-	Nodal segments, shoot apices <i>Segments nodaux, Sommets des pousses</i>	3) + 4) MS	BA, GA ₃ , IBA, IPA 4) IBA (0.5)	Plants in soil <i>Plantes dans le sol</i>	Pattnaik <i>et al.</i> , (1996)
<i>M. Bombycis</i>	Schimonachi Mizusawa	Axillary buds <i>Bourgeons axillaires</i>	3) + 4) MS Macro & micro & LS Vit	3) BAP (0.25-2.0), GA ₃ (0.5-1.0) 4) IBA (0.5)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Jain <i>et al.</i> , (1990)
<i>Morus indica</i> <i>Morus alba</i> <i>M. rotundifolia</i>	Local male LF2 Tonkin					
<i>M. bombycis</i>	Schimanochi	Internodal explants <i>Explants internodaux</i>	1) + 2) + 4) LS	1) 2, 4-D (9.05 µM) NAA (2.6 µM), BA (2.2 µM) 2) BA (8.9 µM) 4) IBA (2.5 µM)	Plants in soil <i>Plantes dans le sol</i>	Jain and Datta (1992)

Table 1. Summary of tissue culture work on mulberry (9).
Tableau 1. Résumé du travail sur la culture des tissus chez le mûrier. (9)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source de l'explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	
<i>Morus bombycis</i>	Kenmochi	Nodal explants <i>Explants nodaux</i>	9) + 4) MS	9) BA (1.0) 4) NAA (0.1)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Yakuwa and Oka. (1988)
<i>M. multicaulis</i>	Gosherani RFS ₁₃₅ RFS ₁₇₅	Anthers <i>Anthères</i>	6) MS	6) IBA (5-10 µM) BAP (5-15 µM)	Embryo formation <i>Formation d'embryon</i>	Sethi <i>et al.</i> , (1992)
<i>M. laevigata</i>	-	Nodal segments <i>Segments nodaux</i>	3) + 4) MS	3) BA (2.5 mg l ⁻¹) 4) IBA + NAA (0.1 mg l ⁻¹)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Hossain <i>et al.</i> , (1992)
<i>M. laevigata</i>	-	Nodal segments <i>Segments nodaux</i>	3) + 4) MS	3) BA (10 µM) 4) IBA (0.5 µM)	Plants in soil <i>Plants dans le sol</i>	Islam <i>et al.</i> , (1993)
<i>M. laevigata</i>	-	Seedling cotyledons <i>Cotyledons des germes</i>	2) ½ LS 4) LS	2) 2, 4-D (0.5), NAA (0.5), BAP (0.2) 4) IBA (0.5)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Jain and Datta, (1992)
<i>Morus alba</i>	S1, S3, S34 cantinchina	Young male inflorescences <i>Inflorescences mâles jeunes</i>	6) MS	6) 2, 4-D (0.5), BAP (2.0)	Embryoids <i>Embryoïdes</i>	Tewary <i>et al.</i> , (1994)
<i>Morus indica</i>	S13					
<i>M. latifolia</i>	Kosen					
<i>M. thoui</i>	-	Apical shoots <i>Pousses apicales</i>	3) MS	BAP (1.0), GA ₃ (0.4)	Plants in soil <i>Plantes dans le sol</i>	Pattnaik and Chand (1997)

Table 1. Summary of tissue culture work on mulberry. (10)
Tableau 1. Résumé du travail sur la culture de tissus chez le mûrier. (10)

Species	Variety/ Genotype	Explant source	Basal medium used	Growth regulators (mg l ⁻¹ or as indicated)	Morpho-genetic response	Reference
Espèces	Variété/ Génotype	Source de l'explant	Milieu de base utilisé	Régulateurs de croissance (mg l ⁻¹ ou comme indiqué)	Réponse morphogénétique	Référence
<i>Morus serrata</i> <i>M. cathayana</i>	-	Nodal segments <i>Segments nodaux</i>	4) ½ MS	IBA, IPA, IAA, (1.0)	Soil / <i>Sol</i>	Pattnaik and Chand (1997)
<i>Morus</i> sp	-	Stem explants <i>Explants de tige</i>	1) + 4) MS	1) NAA, IAA, (2.0 ppm) Kn, (0.1 ppm) 4) NAA (0.2 ppm), Kn (0.02 ppm)	Rhizogenesis from callus <i>Rhizogénèse à partir du cal</i>	Seki <i>et al.</i> (1971)
<i>Morus</i> sp	-	Female flowers <i>Fleurs femelles</i>	Nitsch & White media <i>Milieu blanc</i>	IAA (2.0 ppm)	Flower development <i>Développement de fleurs</i>	Seki <i>et al.</i> (1972)
<i>Morus</i> sp	-	Stem segments <i>Segments de tige</i>	1) MS	1) NAA (2 ppm)	Rhizogenesis from callus <i>Rhizogénèse à partir du cal</i>	Minamizawa and Hirano (1973)
<i>Morus</i> sp	-	Shoot tips <i>Sommets de pousse</i>	3) + 4) MS	3) BA (1.0) 4) NAA (1.0)	Plantlets in soil <i>Plantules dans le sol</i>	Ohyama and Oka (1976)
<i>Morus</i> sp	-	Isolated buds <i>Bourgeons isolés</i>	3) MS	3) BA (1.0) 1) BA (1.0), ABA (10 ppm)	Bud sprouting <i>Débourrage de bourgeons</i>	Ohyama and Oka (1975)

1) - Conditions for callus formation / *conditions de formation du cal*. 2) - Conditions for bud and shoot differentiation / *Conditions de différenciation du bourgeon et de la pousse*. 3) - Conditions for shoot multiplication / *Conditions de multiplication des pousses*. 4) - Conditions for rooting / *Conditions de racinement*. 5) - Conditions for embryogenesis / *Conditions d'embryogénèse*. 6) - Conditions for androgenic haploids / *Conditions des haploïdes androgénétiques*. 7) - Conditions for gynogenic haploids / *Conditions des haploïdes gynogénétiques*. 8) - Conditions for protoplast isolation and culture / *Conditions d'isolement et de culture des protoplastes*. 9) - Cryopreservation / *Cryoconservation*.

'Plants in soil' means *in vitro* derived plantlets which survived after transfer to soil. / « *Plantes dans le sol* » signifie des plants poussés *in vitro* qui ont survécu après avoir été transférés dans le sol.

'Plantlets in soil' means *in vitro* derived plantlets which were transferred to soil, but no further information on survival is given. / « *Plants dans le sol* » signifie des plants obtenus *in vitro* qui ont été transférés dans le sol, mais aucune information n'est donnée sur leur survie.

plants from anther/ovule cultures, iii) isolation and culture of protoplasts, and iv) cryopreservation of germplasm. This review intends to compile the work done on mulberry tissue culture summarised in Table I.

Micropropagation

Ohyama (1970) obtained for the first time complete plants from axillary buds of *Morus alba* on MS medium supplemented with growth regulators. Cytokinins, especially BAP was effective for inducing shoot proliferation in several mulberry genotypes (Ohyama and Oka 1975, 1976, 1987; Oka and Ohyama 1974, 1975, 1978, 1982, 1986; Enomoto, 1987; Patel *et al.*, 1983; Islam *et al.*, 1993; Tewary *et al.*, 1995; Pattnaik *et al.*, 1996; Pattnaik and Chand, 1997; Mhatre *et al.*, 1985; Chattopadhyay and Datta, 1990; Chattopadhyay *et al.*, 1990; Ivanicka, 1987; Verma *et al.*, 1996; Hossain *et al.*, 1992; Tewary and Rao, 1990; Sharma and Thorpe, 1990). A suppression of proliferation was noticed with the use of a higher concentration of BAP (Hossain *et al.*, 1992; Pattnaik *et al.*, 1996; Pattnaik and Chand, 1997).

MS basal medium has been routinely used for micropropagation of shoots in mulberry species (Oka and Ohyama, 1986; Pattnaik and Chand, 1997). The influence of modified basal media such as organic supplements of LS and MS macro and microsalts were tested for shoot proliferation in *M. indica* cv. Local male, *M. alba* cv. LF2, *M. bombycis* cv. Schimonachi and Mizusawa and *M. rotundifolia* cv. Tonkin (Jain *et al.*, 1990). Similarly, MS salts plus B5 vitamins have been tested for micropropagating shoots of *M. indica* (Mhatre *et al.*, 1985). Ivanicka (1987) has tested macroelements of Knop's solution plus microelements and vitamins of MS medium for shoot multiplication in *M. nigra*.

Among various media pH levels tested, pH ranging between 4 and 5 was most suitable for shoot multiplication in *M. alba* (Oka and Ohyama, 1978). A pH of 5.6 was optimal for the micropropagation of shoots in *M. alba* (Enomoto, 1987). The effect of different agar levels on the frequency of shoot formation has been examined in different mulberry genotypes (Zaman *et al.*, 1992b). Best shooting response has been obtained with 0.8 % agar (Patel *et al.*, 1983; Mhatre *et al.*, 1985; Ivanicka, 1987; Yadav *et al.*, 1990; Enomoto, 1987; Jain *et al.*, 1990). The growth of shoots was reduced at higher agar level (1 %) (Oka and Ohyama, 1978).

The most preferred carbon source for micropropagation of shoots was sucrose in *M. alba* (Enomoto, 1987) and *M. laevigata* (Zaman *et al.*, 1992a, 1993). Oka and Ohyama (1978, 1982, 1986), Ohyama (1970) and Ohyama and Oka (1976, 1987) reported fructose to be favourable carbon source for shoot formation in *M. alba*.

The appropriate season for collecting explants from mature trees of mulberry for establishment of cultures was shown to vary with the genotype. Best period for explant collection was November and February (India) in *M. australis* (Pattnaik *et al.*, 1996) and *M. serrata* (Pattnaik and Chand, 1997), whereas the best explanting season for explant collection was July to October in *M. lhou* and *M. cathayama* (Pattnaik and Chand, 1997). Buds collected from mulberry trees during winter months exhibited severe contamination (Ohyama, 1970; Ohyama and Oka, 1976).

The shoot multiplication rate recorded after every month increased for over 7-8 subcultures in *M. laevigata* (Hossain *et al.*, 1992), *M. australis* (Pattnaik *et al.*, 1996) and *M. lhou*, *M. cathayama* and *M. serrata* (Pattnaik and Chand, 1997). Tewary *et al.*, (1995) has demonstrated that shoot multiplication response recorded after every 20 days showed a continuous increase for 5 subcultures in genotypes V1 and S34 of mulberry.

Induction of roots

Roots were induced on shoots within 10-14 days of explanting on an auxin rich medium in *M. laevigata* (Hossain *et al.*, 1992; Islam *et al.*, 1993). NAA and IBA treatments were favourable for promoting rooting on shoots in several species of mulberry (Ohyama, 1970; Ohyama and Oka, 1976; Patel *et al.*, 1983; Jain *et al.*, 1990; Yadav *et al.*, 1990; Islam *et al.*, 1993). A cocktail of IBA and NAA

promoted rooting of shoots in *M. laevigata* (Hossain *et al.*, 1992). Use of combinations of IBA, IAA and IPA enhanced rooting response of *M. australis* (Pattnaik *et al.*, 1996), *M. lhou*, *M. cathayama* and *M. serrata* (Pattnaik and Chand, 1997). Rooting of shoots was obtained on an auxin-free medium in *M. alba* (Enomoto, 1987), *M. indica* cv. Local male, *M. alba* cv. LF₂, *M. bombycis* cv. Schimonachi and Mizusawa and *M. rotundifolia* cv. Tonkin (Jain *et al.*, 1990). The number of roots formed per culture was less on a medium lacking auxins as compared to the root number per culture obtained on a medium supplemented with auxin in *Morus laevigata*. (Islam *et al.*, 1993; Hossain *et al.*, 1992). Addition of BAP or Kn decreased rooting response in *M. indica* cv. Local male, *M. alba* cv. LF₂, *M. bombycis* cv. Schimonachi and Mizusawa and *M. rotundifolia* cv. Tonkin and instead promoted callogenesis at the cut ends of the explants (Jain *et al.*, 1990). Genotypic differences with respect to root formation in some mulberries were reported in *M. indica* cv. Local male, *M. alba* cv. LF₂, *M. bombycis* cv. Schimonachi and Mizusawa and *M. rotundifolia* cv. Tonkin (Jain *et al.*, 1990).

Hardening and transplantation of plants

Plantlets of *M. nigra* with 3-4 nodes were acclimatized and transferred to soil (Yadav *et al.*, 1990). Ivanicka (1987) used plantlets with 30-35 mm long roots for establishment in the field. A pretreatment of plantlets of *M. laevigata* to a temperature of 30°C under 10 h photoperiod for 7-10 days has been reported to be a prerequisite for their successful transfer to soil (Islam *et al.*, 1993). Different potting mixtures such as damp mixture composed of steam sterilised peat and agropelite (2: 1), autoclaved soil, soilrite mixture and vermi-composite have been tested for establishment of regenerated plants of mulberries (Islam *et al.*, 1993; Ivanicka, 1987; Patel *et al.*, 1983; Pattnaik *et al.*, 1996; Pattnaik and Chand, 1997). The plantlets were irrigated with autoclaved ½ Hoaglands nutrient solution and plain water during the process of hardening (Jain *et al.*, 1990; Islam *et al.*, 1993; Hossain *et al.*, 1992). Survival rate of acclimatized plants varied from 75 % in *M. nigra* (Yadav *et al.*, 1990) to 90-95 % in *M. indica* (Jain and Datta, 1992), *M. lhou*, *M. cathayama*, *M. serrata* (Pattnaik and Chand, 1997) and *M. australis* (Pattnaik *et al.*, 1996).

Artificial seeds

Bapat *et al.*, (1987) for the first time reported the production of artificial seeds by encapsulating axillary buds excised from *in vitro* raised shoots of *M. indica* in sodium alginate matrix. Complete plantlets of *M. indica* have been obtained from these synthetic seeds *in vitro* as well as *in vivo* conditions (Bapat and Rao, 1990a). Alginate has proved to be superior matrix for encapsulation of axillary buds of various mulberry species (Bapat *et al.*, 1987; Bapat and Rao, 1990a, 1990b). Use of carbendazim (fungicide) enhanced the frequency of plant production in *M. indica* (Bapat and Rao, 1990b). Machii (1992a) encapsulated adventitious buds from immature leaf cultures of *M. alba* in sodium alginate matrix and obtained cent percent shoot regeneration on MS medium supplemented with BAP. Pattnaik *et al.*, (1995) found 4 % sodium alginate with 75 mM CaCl₂ 2H₂O to be most suitable matrix for production of synthetic seeds in *M. multicaulis* var. Goshocerami, *M. indica* vars. Kanva-2, S-1635 and S-36 and *M. bombycis* var. Kenmochi. The germination potential of encapsulated meristems in *in vitro* and *in vivo* conditions was shown to depend on the genotype.

Adventitious bud formation

Adventitious buds have been induced directly on cotyledon's, leaves, hypocotyls and shoot tip explants in *Morus alba* (Oka and Ohyama, 1978, 1981; Kim *et al.*, 1985). Compared with AE medium, MS basal medium enriched with 2 mg l⁻¹ BA was more effective for inducing bud formation on leaf explants in *M. alba* (Kim *et al.*, 1985). Histology of bud formation has indicated that shoot buds developed from the cut ends of the midrib of leaves in *M. alba*. Ohyama and Oka (1982) reported MS medium with 10 mg l⁻¹ N-(2-chloro-4-Pyridyl)-N-Phenylurea (4PU) supplements induced adventitious bud formation at the apical ends of hypocotyl segments of *M. alba*. Thidiazuran was very effective cytokinin for inducing adventitious bud formation on leaf explants of mulberry (Thin and

Katagiri, 1994). Efficiency of adventitious bud induction on the leaves of *Morus alba* var. Ichinose cultured in a liquid MS medium containing 2 mg l^{-1} BAP was approximate twice than the adventitious bud formation on leaves cultured on an agar solidified MS medium containing the same amount of BAP (Katigiri and Thinh, 1994). The shoots developed from cultured shoot tips of *M. alba* have been rooted on a medium supplemented with 0.01 mg l^{-1} NAA (Hayashi and Oka, 1995). Complete plantlet regeneration was obtained through adventitious shoot formation from leaf explants of 12 varieties of mulberry on a medium with cytokinin and somatotropin supplements (Wen *et al.*, 1990).

Callus formation and organogenesis

Attempt at *in vitro* culture of cambial region from the wedge shaped pieces of young twigs of *Morus alba* was first made by Narasimhan *et al.*, (1970). In the same year Ohyama (1970) and a year later, Ghugale *et al.*, (1971) and Seki *et al.*, (1971) obtained callus from root and hypocotyl explants of *M. alba* on MS medium supplemented with 1 mg l^{-1} 2, 4-D and 2 ppm IAA and NAA. MS basal medium was effective medium for callus initiation in some genotypes of mulberry (Narayan *et al.*, 1989; Jain and Datta, 1992; Sahoo *et al.*, 1997). Callus of *M. alba* grew vigorously after subculturing on MS medium containing calcium pantothenate (1.0 ppm) and biotin (0.1 ppm) (Narasimhan *et al.*, 1970). Seki *et al.*, (1971, 1974) stressed the need of an auxin in the medium to induce callus formation in *M. alba*. Explants cultured on MS medium without any growth regulator could not initiate callus in *M. alba* (Ghugale *et al.*, 1971). Supplementing the medium with cytokinins and other organic additives such as casein hydrolysate, coconut milk and sugars followed by periodical subculturing tends to keep the callus of *M. alba* growing more rapidly (Minamizawa and Hirano, 1973; Oka and Ohyama, 1973; Ohyama and Oka, 1976). Mhatre *et al.*, (1985) and Jain and Datta (1992) have shown that callus induction from nodal segments, internodal segments, leaves and axillary buds of *M. bombycis* and *M. indica* need pretreatments with low BAP levels ($0.5\text{--}2 \text{ mg l}^{-1}$) for different period. Pretreatment of hypocotyl explants with BAP was not essential for inducing callus formation in *M. alba* (Kathiravan *et al.*, 1995, 1997). Calli were maintained on a medium containing 2, 4-D together with BAP or Kn for about 2 months in *M. alba* (Oka and Ohyama, 1976; Tewary *et al.*, 1989) and *M. indica* (Sahoo *et al.*, 1997).

Shoot regeneration from callus of *M. alba* was first obtained by Narayan *et al.*, (1989) on MS medium containing 2.0 mg l^{-1} BAP. Organogenesis from callus cultures was demonstrated in *M. alba* on LS medium containing 0.5 mg l^{-1} NAA and 0.75 mg l^{-1} BA (Kathiravan *et al.*, 1995), in *M. bombycis* on MS medium containing 8.9 mM BAP (Jain and Datta, 1992) and in *M. indica* on MS medium enriched with 0.5 mg l^{-1} BA (Sahoo *et al.*, 1997). A common feature of these protocols for inducing shoot differentiation from callus cultures has been the use of BAP in the medium. Shoot forming ability of calli was noticed to depend upon the source of explant used for initiating callus cultures (Sahoo *et al.*, 1997). Internodal segments were better explants than hypocotyl and leaf explants for initiating shoot regenerating callus cultures in *M. bombycis* (Jain and Datta, 1992) and in *M. indica* (Sahoo *et al.*, 1997).

Rooting on shoots was obtained on MS medium supplemented with 0.5 mg l^{-1} NAA in *M. alba* (Narayan *et al.*, 1989), with 2.5 mM IBA in *M. bombycis* (Jain and Datta, 1992), with 0.75 mg l^{-1} IBA in *M. alba* (Kathiravan *et al.*, 1995) and with 1.0 mg l^{-1} IBA in *M. indica* (Sahoo *et al.*, 1997). Half strength MS medium without any auxins also induced rooting on shoots but these roots appeared to be thin and slender compared to roots formed on the shoots cultured on an auxin supplemented medium (Sahoo *et al.*, 1997; Jain and Datta, 1992). The rooted plantlets of *M. alba*, *M. bombycis* and *M. indica* were established in the field.

Regenerated plants of *M. alba* showed variation from the mother plant and possessed thick leaves, short internodes and high branching pattern (Narayan *et al.*, 1989), whereas the regenerated plants of *M. indica* (Jain and Datta, 1992) and *M. alba* (Kathiravan *et al.*, 1995; Sahoo *et al.*, 1997) did not show any change in morphological characteristics.

Somatic embryogenesis

There are only two reports available on somatic embryogenesis in mulberry (Thinh and Katagiri, 1995; Shajahan *et al.*, 1995). Modified MS medium comprising of MS mineral salts and B₅ vitamins and thidiazuran ($0.1 - 2.0 \text{ mg l}^{-1}$) induced direct somatic embryo formation on the hypocotyl and root explants. Heart-shaped embryo like structures were formed from suspension cultures of hypocotyl calli of *M. alba* cv. MR2 on MS medium fortified with 1.0 mg l^{-1} 2, 4-D and 0.5 mg l^{-1} BA. The embryos failed to develop into mature embryos (Shajahan *et al.*, 1995).

Haploids

A number of papers report successful haploid embryo production of mulberry from anther and ovule cultures (Katagiri and Modala, 1993; Sethi *et al.*, 1992; Sita *et al.*, 1991; Jain *et al.*, 1996). Katagiri (1989b) obtained embryo like and organ-like structures from pollen callus of *M. alba* on modified MS medium containing MS salts, B₅ vitamins and 1.0 mg l^{-1} BA and IBA. Sethi *et al.*, (1992) reported production of pollen embryos directly from cultured anthers of *Morus* sp var. Goshorami on MS medium containing IBA, BAP, Kn and AgNO₃. These embryos germinated and produced leafy shoots without roots. Shoots were multiplied and rooted to obtain complete plantlets. Cold pretreatment of anthers of *M. indica* for 24 h and their subsequent culture on modified Bourgin medium supplemented with 0.5 mg l^{-1} NAA, 1.0 mg l^{-1} BAP and 8 % sucrose resulted in the formation of haploid callus (Jain *et al.*, 1996). Inclusion of PVP and high sucrose level reduced browning of callus and promoted embryogenesis. Cytological studies of root tips derived from androgenic calli of *M. indica* showed the presence of diploid chromosome number ($n = 14$) in 75 % metaphase plates examined (Jain *et al.*, 1996).

One study has reported gynogenic haploid plant regeneration in mulberry (Sita *et al.*, 1991). A total of 65 plantlets were produced from ovary cultures. These plantlets did not survive in the field.

Protoplast isolation and culture

Protoplasts of mulberry have been successfully isolated from callus cultures (Ohnishi and Kiyama, 1987a) and mesophyll cells (Tewary and Lakshmisita, 1992; Katagiri, 1988). Primary callus culture gave better protoplast yield than secondary callus cultures of mulberry (Ohnishi and Kiyama, 1987b). Of the different enzyme combinations tested, best results in terms of the yield of protoplast were obtained by the use of cellulase (2 %), macerozyme (1 %) and macerase (0.5 %) (Tewary and Lakshmisita, 1992). Katagiri (1989a) reported the division and colony formation of mesophyll protoplast in *M. acidosa*. Complete plants were obtained from calli initiated from mesophyll protoplasts of mulberry through organogenesis and somatic embryogenesis on MA medium (Ming *et al.*, 1992). Fusion of mulberry protoplasts was achieved using chemical fusogens (Ohnishi and Kiyama, 1987b) and by electrofusion (Ohnishi and Tanabe, 1989). There is no report on plant regeneration from fused protoplast of mulberry.

Genetic engineering

Machii (1989) for the first time isolated DNA from *Morus acidosa* leaves. This method can be employed for RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) / RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) evaluation, which in turn can be used for studying the genetic variability in mulberry. Machii (1990) genetically transformed mulberry (*Morus alba* L.) leaves using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 as a vector. He was successful in transferring Kanamycin resistant gene through Ti plasmid PB1121 in mulberry leaves. Transformed leaves were GUS positive.

Cryopreservation

Vegetative buds of *M. bombycis* have been cryopreserved by prefreezing nodal explants at -10°C or -20°C alongwith rapid thawing at 37°C and by prefreezing the nodal explants at -20°C or -30°C alongwith slow thawing at 0°C (Yakuwa and Oka, 1988). Cryopreserved mulberry shoot tips and

lateral buds obtained from *in vitro* raised mulberry shoots have been regenerated into complete plants (Niino, 1990; Niino and Oka, 1990; Niino *et al.*, 1992a; Ohnishi and Kobayashi, 1986). Cryopreserved winter buds attached with shoot pieces has been shown to produce complete plants (Niino *et al.*, 1991). Shoot tips of winter buds of mulberry cryopreserved in liquid nitrogen were rooted and regenerated into complete plants (Niino *et al.*, 1992b).

CONCLUSION

The variety of experimental systems which the genus *Morus* sp. (mulberry) offer has been extolled, and extensive but scattered literature on tissue culture researches on 12 species has been discussed under convenient headings. Most of tissue culture studies on mulberry deals with the micropropagation only, and that too upto plantlet formation or in few cases upto hardening of these plants. The most important aspect of tissue culture raised plants is their field performance and economy of the plants raised with respect to the plants raised by cuttings. This review on different tissue culture aspects of mulberry conceives tremendous scope to perceive certain areas such as field performance (nutritional value) and genotypic stability of tissue culture raised plants in comparison to plants raised by conventional methods, somatic embryogenesis, haploid production, polyploid production, stress tolerant plant production, genetically transformed plant production, development of different molecular markers for agronomic traits and improvement of mulberry plants using modern tools of molecular genetics. It is urged that tissue culture researches on mulberry should be goal oriented and provide quantitative data for emerging biotechnological opportunities in moriculture.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to Head Department of Botany for providing necessary laboratory facilities and Dr. I. A. Hamal for critical discussions. AKW acknowledges Department of Biotechnology and Central Silk Board (Govt. of India) for financial assistance for this work. BSB is thankful to UGC for the award of NET fellowship.

REFERENCES

- ANGRISH R., DHIR K. K., NEHRANWALIA I., PUBBI S. (1986) Seasonal morphogenetic behaviour of generative buds of *Morus nigra* cultured *in vitro*. J. Plant Physiol., 122: 267-274.
- BAPAT V.A., RAO P.S. (1990a) Somatic seeds of sandalwood (*Santalum album* L.) and Mulberry (*Morus indica* L.). In: (Eds) Shetty, H.S. and Parkash, H.S. Proc. Natl. Semi. on Adv. in Seed Sci. and Tech., Univ. of Mysore, Dec 14-16, 1989; pp. 372-377.
- BAPAT V.A., RAO P.S. (1990b) *In vivo* growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.) Plant Cell Tiss. Org. Cult., 20: 69-70.
- BAPAT V.A., MHATRE M., RAO P.S. (1987) Propagation of *Morus indica* L. (Mulberry) by encapsulated shoot buds. Plant Cell Rep. 6: 393-395.
- CHAKRABORTI S.P., VIJAYAN K., ROY B.N., QADRI S.M.H. (1998) *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.) Plant Cell Rep. 17: 799-803.
- CHATTOPADHYAY S., DATTA S.K. (1990) A rapid clonal propagation of mulberry tree (*Morus alba*) through tissue culture. Proc. 76th Ind. Sci. Cong. Part III (Ab): 208-209.
- CHATTOPADHYAY S., CHATTOPADHYAY S., DATTA S.K. (1990) Quick *in vitro* production of mulberry (*Morus alba*) plantlets for commercial purpose. Ind. J. Exp. Biol. 28: 522-525
- DANDIN S.B., SENGUPTA K. (1988) Mulberry cultivation as high bush and small tree in hilly regions. Central Sericultural Research & Training Institute. Publication. pp 3-4.
- ENOMOTO S. (1987) Preservation of genetic resources of mulberry by means of tissue culture. JARQ. 21: 205-210.

- GAMBORG O.L., MILLER R.A. and OJIMA K. (1968) Nutrient requirements for suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- GHUGALE D.D., KULKARNI D.D., NARASIMHAN R. (1971) Effect of auxins and gibberellic acid on growth and differentiation of *Morus alba* and *Populus nigra* tissues *in vitro*. *Ind. J. Expt. Biol.* 9: 381-384.
- HAYASHI K., OKA S. (1995) Formation of multiple bud bodies and plant regeneration in the mulberry, *Morus alba*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 64: 117-123.
- HOSSAIN M., RAHMAN S.M., ZAMAN A., JOARDER O.I., ISLAM R. (1992) Micropropagation of *Morus laevigata* Wall. from mature trees. *Plant Cell Rep.* 11: 522-524.
- ISLAM R., ZAMAN A., JOARDER O.I., BARMAN A.C. (1993) *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* Wall. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 33: 339-341.
- ISLAM R., JOARDER O.I., HOSSAIN M., ZAMAN A., BARMAN A.C. (1994) Clonal propagation of *Morus alba* L. Cv S, from nodal explants of mature trees: maintenance of proliferating cultures. *Sericologia*. 34: 343.
- IVANICKA J. (1987) *In vitro* micropropagation of mulberry, *Morus nigra* L. *Scientia-Hort.* 32: 33-39.
- JAIN A.K., DATTA R.K. (1992) Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koidz): Factors influencing morphogenetic potential in callus cultures. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 29: 43-50.
- JAIN A.K., DANDIN S.B., SENGUPTA K. (1990) *In vitro* propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. *Plant Cell Reps* 8: 737-740.
- JAIN A.K., SARKAR A., DATTA R.K. (1996) Induction of haploid callus and embryogenesis *in vitro* cultured anthers of mulberry (*Morus indica*) *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 44: 143-147.
- KATAGIRI K. (1988) Differences in cell division in mulberry mesophyll protoplast culture due to species and culture conditions. *J. Seric. Sci. Jpn.* 57: 445-446.
- KATAGIRI K. (1989a) Colony formation in culture of mulberry mesophyll protoplast. *J. Seric. Sci. Jpn.* 58: 267-268.
- KATAGIRI K. (1989b) Callus induction in culture of mulberry pollen. *J. Seric. Sci. Jpn.* 58: 527-529.
- KATAGIRI K., MODALA V. (1993) Induction of calli and organ-like structures in isolated pollen culture of mulberry, *Morus australis* Poir. *J. Seric. Sci. Jpn.* 62: 1-6.
- KATAGIRI K., THINH N.T. (1995) Relationship between growth substance and induction of somatic embryogenesis in mulberry. *J. Seric. Sci. Jpn.* 64: 469-471.
- KATAGIRI K., THINH N.T. (1994) Effect of rotary shaking on the induction of adventitious buds in mulberry leaves cultured *in vitro*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 63: 278-283.
- KATHIRAVAN K., SHAJAHAN A., GANAPATHI A. (1995) Regeneration of plantlets from hypocotyl derived callus of *Morus alba*. *Israel J. Plant Sci.* 43: 259-262.
- KATHIRAVAN K., GANAPATHI A., SHAJAHAN A. (1997) Adventitious shoot formation and plant regeneration from callus cultures of mulberry (*Morus alba* L.) *Sericologia*. 37: 727-733.
- KIM H.R., PATEL K.R., THORPE T.A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. *Bot. Gaz.* 146: 335-340.
- * KNOP W. (1884) Bereitung einer konzentrierten nährstofflösung für pflanzen. *Landwirtsch Versuchsstn.* 30: 292-294.
- LINSMAIER E.M., SKOOG F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- LLOYD G., MC COWN B. (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30: 421-427.
- MACHII H. (1989) Isolation of total mulberry DNA. *J. Seric. Sci. Jpn.* 58: 349-350.
- MACHII H. (1990) Leaf disc transformation of mulberry plants (*Morus alba* L.) by *Agrobacterium* Ti plasmid. *J. Seric. Sci. Jpn.* 59: 105-110.
- MACHII H. (1992a) *In vitro* growth of encapsulated adventitious buds in mulberry, *Morus alba* L. *Jpn. J. Breeding*. 42: 553-559.
- MACHII H. (1992b) Organogenesis from immature leaf cultures in mulberry, *Morus alba* L. *J. Seric. Sci. Jpn.* 61: 512-519.

- MIHATRE M., BAPAT V.A., RAO P.S. (1985) Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.) Plant Cell Rep. 4: 78-80.
- MIKAMI T., KINOSHITA T. (1988) Genotypic effects on the callus formation from different explants of rice *Oryza sativa* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 12: 311-314.
- MINAMIZAWA K., HIRANO H. (1973) Effect of the concentrations of several sugars on differentiation in excised stem segments of mulberry trees cultured *in vitro*. J. Seric. Sci. Jpn. 43: 51-57.
- MING W.Z., XU Z.H., XU N., REN H.M. (1992) Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Morus alba*. Plant Physiol. Commu. 28: 248-249.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NARASIMHAN R., DHURVA B., PARANJPE S.V., KULKARNI D.D., MASCARENHAS A.F. (1970) Tissue culture of some woody species. Proc. Ind. Acad. Sci. LXXI: 204-212.
- NARAYAN P., CHAKRABORTY S., RAO G.S. (1989) Regeneration of plantlets from the callus of stem segments of mature plants of *Morus alba* L. Proc. Ind. Nat. Sci. Acad. B55: 469-472.
- NIINO T. (1990) Establishment of the cryopreservation procedure of mulberry (*Morus*) shoot tips from *in vitro* grown shoot. J. Seric. Sci. Jpn. 59: 135-142.
- NIINO T., OKA S. (1990) Plant regeneration from *in vitro* grown mulberry shoot tips frozen in liquid nitrogen. J. Seric. Sci. Jpn. 59: 111-117.
- NIINO T., YAKUWA H., NOJIRI K., SAKAI A. (1991) Improved procedures for the cryopreservation of mulberry using winter buds. J. Seric. Sci. Jpn. 60: 394-399.
- NIINO T., SAKAI A., YAKUWA H. (1992a) Cryopreservation of dried shoot tips of mulberry winter buds and subsequent plant regeneration. Cryo-letters. 13: 51-58.
- NIINO T., SAKAI A., ENOMOTO S., MAGOSI J., KATO S. (1992b) Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of mulberry by vitrification Cryo-letters. 13: 303-312.
- OHNISHI T., KOBAYASHI Y. (1986) Initial growth of mulberry stem apex cultures on liquid culture medium with a filter paper bed. J. Seric. Sci. Jpn. 55: 259-260.
- OHNISHI T., KIYAMA S. (1987a) Increase in yield of mulberry protoplasts by treatment with chemical substance. J. Seric. Sci. Jpn. 56: 407-410.
- OHNISHI T., KIYAMA S. (1987b) Effect of changes of the temperature, pH and Ca ion concentration of the solutions used for protoplast fusion on the improvement of the fusion ability of mulberry protoplasts. J. Seric. Sci. Jpn. 56: 418-421.
- OHNISHI T., TANABE K. (1989) On the protoplast fusion of mulberry and paper mulberry by electrofusion method. J. Seric. Sci. Jpn. 58: 353-354.
- OHNISHI T., YASUKURA F., KORODA Y. (1991) Simple freezer storage method of mulberry calluses. J. Seric. Sci. Jpn. 60: 28-33.
- OHYAMA K. (1970) Tissue culture in mulberry tree. JARQ. 5: 30-34.
- OHYAMA K., OKA S. (1975) Effect of abscisic acid and gibberellic acid on bud break in mulberry plants. J. Seric. Sci. Jpn. 44: 321-326.
- OHYAMA K., OKA S. (1976) Regeneration of whole plants from isolated shoot tips of mulberry tree. J. Seric. Sci. Jpn. 45: 115-120.
- OHYAMA K., OKA S. (1982) Multiple shoot formation from mulberry (*Morus alba* L.) hypocotyls by N-(2-Chloro-4-Pyridyl)-N-Phenylurea. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tiss. and Cell Cult. pp 149-150.
- OHYAMA K., OKA S. (1987) Mulberry in: (Eds) Bonga, J.M. and Durzan. Cell and Tissue Culture in Forestry. Dordrecht (Netherlands). Martius Nijhoff Publishers. pp. 272-284.
- OKA S., OHYAMA K. (1973) Induction of callus and effects of constituents of medium on callus formation of mulberry trees. J. Seric. Sci. Jpn. 42: 317-324.
- OKA S., OHYAMA K. (1974) Studies on *in vitro* culture of excised buds in mulberry tree. I. Effects of growth substance on the development of shoots and organ formation from winter buds J. Seric. Sci. Jpn. 43: 230-235.
- OKA S., OHYAMA K. (1975) Studies on *in vitro* culture of excised bud in mulberry tree. II. Effect of growth substances on the development of shoots from bud. J. Seric. Sci. Jpn. 44:444-450.

- OKA S., OHYAMA K. (1976) A study on the medium for the sub-culture of mulberry callus. J. Seric. Sci. Jpn. 45: 385-391.
- OKA S., OHYAMA K. (1978) Studies on *in vitro* culture of excised buds in mulberry tree. III. Effects of agar concentration, pH and sugars of medium on the development of shoot from winter buds. J. Seric. Sci. Jpn. 47: 15-20.
- OKA S., OHYAMA 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., OHYAMA K. (1982) Sugar utilisation in mulberry (*Morus alba* L.) bud culture. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tiss. and cell Cult. pp. 67-68.
- OKA S., OHYAMA K. (1986) Mulberry (*Morus alba* L.) In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in Agri and Forestry. Vol. I - Trees. Springer - Verlag-Berlin, Heidelberg, New York. pp. 384-392.
- PATEL G.K., BAPAT V.A., RAO P.S. (1983) *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*: Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. Z. Pflanzenphysiol. 111: 465-468.
- PATTNAIK S.K., CHAND P.K. (1997) Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. lhou* Koiz. and *M. serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. Plant Cell Rep. 16: 503-508.
- PATTNAIK S.K., SAHOO Y., CHAND P.K. (1995) Efficient plant retrieval from alginate-encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees. Scientia-Hort., 61: 227-239.
- PATTNAIK S.K., SAHOO Y., CHAND P.K. (1996) Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. Syn. *M. acidosa* Griff. Plant Cell Rep. 15: 841-845.
- QIAN C., CHEN Z., CEN M., LIN M., XU X. (1982) Improvement of dedifferentiation medium in anther culture of *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. Annu. Rep. Inst. Genet. Acad. Sin.: 1-19.
- RAGHUNATH M.K., CHAKRABORTI S.P., ROY B., SEN S.K. (1992) Micropropagation of superior hybrids through axillary bud culture in mulberry (*Morus* L.) Cell and chromosome Res. 15: 12.
- RAMESH S.R., BASAVAIHAH (1989) Systematic position of the genus *Morus* L. In: Sengupta K., Dandin S.B. (Ed.) Genetic resources of mulberry and utilisation. Central Sericulture Research and Training Institute (CSB). Mysore. pp. 43-48.
- SAHOO Y., PATTAIK S.K., CHAND P.K. (1997) Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. Scientia Hort. 69: 85-98.
- SEKI H., TAKEDA M., TRUTRUMI K., USHIKI Y. (1971) Studies on the callus culture of the mulberry tree. The effect of concentrations of auxin and kinetin on the callus culture of the mulberry stem. J. Seric. Sci. Jpn. 40: 75-81.
- SEKI H., TAKEDA M., YAMAGUCHI T. (1974) Studies on the callus culture of the mulberry tree (II) The callus culture of the embryo and endosperm of the mulberry seed. J. Seric. Sci. Jpn. 43: 487-491.
- SETHI M., BOSE S., KAPUR A., RANGASWAMY N.S. (1992) Embryo differentiation in anther cultures of mulberry. Ind. J. Exp. Biol. 30: 1146-1148.
- SHAJAHAN A., KATHIRAVAN K., GANAPATHI A. (1995) Induction of embryo-like structures by liquid culture in mulberry (*Morus alba* L.) Breed Sci. 45: 413-417.
- SHARMA K.K., THORPE T.A. (1990) *In vitro* propagation of mulberry (*Morus alba* L.) through nodal segments. Scientia Hort. 42: 307-320.
- SITA G.L., RAVINDRAN S., PRAKASH J. (1991) Gynogenic plants from ovary culture of mulberry (*Morus indica*). Horticulture - new technologies and application. Proc. Intl. Seminar on new frontier in horticulture. Nov. 25-28. 12: 225-229.
- SNIR L. (1982) *In vitro* propagation of sweet cherry cultivars. Hort. Sci. 17: 192-193.
- TEWARY P.K., GUPTA B.K., RAO G.S. (1989) *In vitro* studies on the growth rate of callus of mulberry (*Morus alba* L.) Ind. J. Forestry. 12: 34-35.
- TEWARY P.K., RAO G.S. (1990) Multiple shoot formation through shoot apex culture of mulberry. Ind. J. Forestry. 13: 109-111.
- TEWARY P.K., LAKSHMISITA G. (1992) Protoplast isolation, purification and culture in mulberry (*Morus* spp.) Sericologia. 32: 651-657.

- TEWARY P.K., CHAKRABORTHY S.P., SINHA S.S., DATTA R.K. (1994) *In vitro* study on pollen culture in mulberry A.C. *Botanica*, Indica, 22: 186-190.
- TEWARY P.K., SARKAR A., KUMAR V., CHAKRABORTI S. (1995) Rapid *in vitro* multiplication of high yielding mulberry (*Morus* sp.) genotypes V₁ and S₃₄ Ind. J. Seric. 34: 133-136.
- THINH N.T., KATAGIRI K. (1994) Induction of adventitious buds in mulberry leaves by Thidiazuron. J. Seric. Sci. Jpn. 63: 514-516.
- THINH N.T., KATAGIRI K. (1995) Induction of direct somatic embryogenesis in mulberry embryos cultured *in vitro* J. Seric. Sci. Jpn. 64: 72-74.
- VERMA B., PATNI V., KANT U., ARYA H.C. (1996) Direct plantlet regeneration from axillary buds of *Morus alba* L. (Grafted, var-White). J. Ind. Bot. Soc. 75: 45-47.
- VON ARNOLD S., ERIKSSON T. (1981) *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J. Bot. 59: 870-874.
- WEN K.L., ZHENG S.X., BIAN Y.S. (1990) Leaf culture and plant regeneration of different mulberry varieties. Sci. Seric. 16: 198-202.
- * WHITE P.R. (1963) The cultivation of animal plant cells. 2nd edition. Ronald Press New York.
- YADAV U., LAL M., JAISWAL V.S. (1990) Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. Scientia Hort. 44: 61-67.
- YAKUWA H., OKA S. (1988) Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) stored in liquid nitrogen. Ann. Bot. 62: 79-82.
- ZAMAN A., ISLAM R., JOARDER O.I., BARMAN A.C. (1992a) Effects of different sugars on *in vitro* shoot proliferation of *Morus alba* cv. S1. Bull. Seric. Res. 3: 14-17.
- ZAMAN A., ISLAM R., HOSSAIN M., HOSSAIN A.B.M.B., BARMAN A.C., JOARDER N. (1992b). *In vitro* clonal propagation of mulberry (*Morus* cv S1) effects of agar and pH on shoot proliferation. Bull. Seric. Res. 3: 51-54.
- ZAMAN A., ISLAM R., BARMAN A.C., AHAD A., QADER M.A., JOARDER O.I. (1993) Effects of sucrose, pH and temperature on *in vitro* rooting of mulberry microshoots of *Morus alba* cv S1. Bull. Seric. Res. 4: 10-13.
- ZAMAN A., ISLAM R., JOARDER O.I. (1997) Field performance and biochemical evaluation of micropropagated mulberry plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 51: 61-64.

* Original paper not seen.

LES CULTURES DE TISSU CHEZ LE MURIER (*MORUS*)

A.K. WAKHLU & B. SINGH BHAAU*

Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Botany University of Jammu, Jammu - 180 006, Inde

Le mûrier est une plante importante pour l'industrie séricicole. Au cours des trois dernières décennies, un travail considérable a été effectué sur la culture des tissus de cette plante. Ces études se sont concentrées sur la micropropagation, l'organogenèse, l'embryogenèse somatique, les graines synthétiques, la production haploïde, la cryoconservation, la culture de protoplastes et le génie génétique. Cette revue s'intéresse aux études sur la biotechnologie du mûrier.

ABREVIATIONS

MS : Murashige et Skoog (1962), **AE** : Von-Arnold et Eriksson (1981), **WPM** : Milieu pour plantes ligneuses (Lloyd et McCown, 1980), **B5** : Gamborg et coll., (1968), **LS** : Linsmaier et Skoog (1965), **Knop** = Knop (1884), milieu Snir (Snir, 1982), **MB** : Bourgin modifié (Qian et coll., 1982), **White**- white (1963).

REGULATEURS DE CROISSANCE

NAA : acide naphthalèneacétique α , **IAA** : Acide indol-3 acétique, **IBA** : Acide Indole-3 butyrique-, **2,4-D** : Acide dichlorophenoxy acétique, **BAP**, 6-benzylaminopurine, **Kn** : Kinétine, **Z** : Zéatine, **2-ip 6** = (YY-diméthylamino) Purine, **GA3** : - Acide gibbérélique, **2,4,5, T** - 2, 4, 5 acide trichlorophénoxy acétique, **4PU-N**-(2Chloro-4-pyridyle)-N'-Phénylurée, **TDZ** : Thiadiazuran, **CM** - lait de coco, **IPA** - Acide indole-3 propanique.

INTRODUCTION

Le genre *Morus* appartenant à la famille des Moraceae comprend près de 65 espèces en zone tropicale et subtropicale (Ramesh et Basavaiah, 1989). De nombreuses variétés provenant de ces espèces sont cultivées à l'échelle commerciale dans l'industrie séricicole en Chine, au Japon, en Corée, dans l'ancienne U.R.S.S et en Inde (Oka et Ohyama, 1986). Jusqu'à présent environ 80 publications de recherche sont parues en anglais sur la culture des tissus chez 12 espèces de ce genre. Ces études se sont penchées sur l'établissement de protocoles pour : i) la micropropagation de génotypes spécifiques, ii) la production de plantes haploïdes à partir de cultures d'anthers/ovules, iii) l'isolement et la culture de protoplastes et iv) la cryoconservation des germoplasmes. Cette revue se propose de regrouper les études faites sur la culture de tissus de mûrier résumées dans le Tableau 1.

* Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Botany, University of Jammu, Jammu - 180 006, Inde.

Micropropagation :

Ohyama (1970) a pour la première fois obtenu des plantes complètes à partir de bourgeons axillaires de *Morus alba* sur un milieu MS complété avec des régulateurs de croissance. Les cytokinines, surtout le BAP, sont efficaces pour induire la prolifération de pousses chez plusieurs génotypes de mûrier (Ohyama et Oka 1975, 1976, 1987 ; Oka et Ohyama, 1974, 1975, 1978, 1982, 1986 ; Enomoto, 1987 ; Patel et coll., 1983 ; Islam et coll., 1993 ; Tewary et coll., 1995 ; Pattnaik et coll., 1996 ; Pattnaik et Chand, 1997 ; Mhatre et coll., 1985 ; Chattopadhyay et Datta, 1990 ; Chattopadhyay et coll., 1990 ; Ivanicka, 1987 ; Verma et coll., 1996 ; Hossain et coll., 1992 ; Tewary et Rao, 1990 ; Sharma et Thorpe, 1990). On a remarqué que la prolifération était stoppée avec une concentration élevée de BAP (Hossain et coll., 1992 ; Pattnaik et coll., 1996 ; Pattnaik et Chand, 1997).

Le milieu MS de base est couramment utilisé pour la micropropagation des pousses chez des espèces de mûrier (Oka et Ohyama, 1986 ; Pattnaik et Chand, 1997). L'influence du milieu de base modifié avec des compléments organiques de macro et micro sels LS et MS sur la prolifération des pousses a été testée chez *M. indica* cv. mâle local, *M. alba* cv LF₂, *M. bombycis* cv. Schinonachi et Mizusawa et *M. rotundifolia* cv. Tonkin (Jain et coll., 1990). De même, des sels MS couplés avec des vitamines B₅ ont été testés pour la micropropagation des pousses de *M. indica* (Mhatre et coll., 1985). Ivanicka (1987) a testé l'influence des macroéléments de la solution de knop additionnée de microéléments et de vitamines dans un milieu MS sur la multiplication des pousses chez *M. nigra*.

Parmi les différents niveaux de pH testés dans les milieux, un pH entre 4 et 5 est plus adapté à la multiplication des pousses chez *M. alba* (Oka et Ohyama, 1978). Un pH de 5,6 est optimal pour la micropropagation des pousses chez *M. alba* (Enomoto, 1987). L'effet de différents niveaux d'agar sur la fréquence de formation des pousses a été examiné chez différents génotypes de mûrier (Zaman et coll., 1992b). La meilleure réponse est obtenue avec une gélose de 0,8 % (Patel et coll., 1983 ; Mhatre et coll., 1985 ; Ivanicka, 1987 ; Yadav et coll., 1990 ; Enomoto, 1987 ; Jain et coll., 1990). La croissance des pousses diminue avec un taux de gélose plus élevé (1 %) (Oka et Ohyama, 1978).

La source de carbone préférée pour la micropropagation des pousses chez *M. alba* (Enomoto, 1987) et *M. laevigata* (Zaman et coll., 1992a, 1993) est le saccharose. Oka et Ohyama (1978, 1982, 1986), Ohyama (1970) et Ohyama et Oka (1976, 1987) ont signalé que le fructose est une source de carbone favorable pour la formation de pousses chez *M. alba*.

La saison propice au recueil d'explants provenant d'arbres matures pour établir des cultures varie en fonction des génotypes. La meilleure période pour recueillir les explants est en novembre et février (Inde) chez *M. australis* (Pattnaik et coll., 1996) et chez *M. serrata* (Pattnaik et Chand, 1997), tandis que la meilleure saison est de juillet à octobre chez *M. lhou* et *M. cathayama* (Pattnaik et Chand, 1997). Les bourgeons recueillis sur des mûriers pendant l'hiver sont sévèrement contaminés (Ohyama, 1970 ; Ohyama et Oka, 1976).

Le taux de multiplication des pousses enregistré chaque mois augmente pendant plus de 7 à 8 sous-cultures chez *M. laevigata* (Hossain et coll., 1992), *M. australis* (Pattnaik et coll., 1996) et *M. lhou*, *M. cathayama* et *M. serrata* (Pattnaik et Chand, 1997). Tewary et coll., (1995) ont démontré que la réponse de multiplication des pousses enregistrée tous les 20 jours augmente continuellement au cours de 5 souscultures chez les génotypes de mûrier V₁ et S₃₄.

Induction des racines :

Les racines sont induites à partir des pousses, 10 à 14 jours après l'explantation sur un milieu riche en auxine chez *M. laevigata* (Hossain et coll., 1992 ; Islam et coll., 1993). Les traitements NAA et IBA sont favorables pour la promotion du racinement des pousses chez plusieurs espèces de mûrier (Ohyama, 1970 ; Ohyama et Oka, 1976 ; Patel et coll., 1983 ; Jain et coll., 1990 ; Yadav et coll., 1990 ; Islam et coll., 1993). Un mélange d'IBA et de NAA induit le racinement des pousses chez *M. laevigata* (Hossain et coll., 1992). L'utilisation de combinaisons d'IBA, d'IAA et d'IPA favorise la réponse de racinement chez *M. australis* (Pattnaik et coll., 1996), *M. lhou*, *M. cathayama* et *M. serrata* (Pattnaik

et Chand, 1997). Le racinement est obtenu dans un milieu sans auxine chez *M. alba* (Enomoto, 1987), *M. indica* cv. mâle local, *M. alba* cv. LF2, *M. bombycis* cv., Schimonachi et Mizusawa et *M. rotundifolia* cv. Tonkin (Jain et coll., 1990). Le nombre de racines s'étant formées par culture est inférieur chez *Morus laevigata* avec un milieu sans auxines comparé au nombre de racines par culture obtenu dans un milieu complète avec de l'auxine (Islam et coll., 1993 ; Hossain et coll., 1992). L'ajout de BAP ou de Kn baisse la réponse de racinement chez *M. indica* cv. mâle local, *M. alba* cv LF2, *M. bombycis* cv. Schimonachi et Mizusawa et *M. rotundifolia* cv. Tonkin et au contraire promeut la callogénèse aux extrémités coupées des explants (Jain et coll., 1990). Des différences génotypiques existent par rapport à la formation de racine pour certains mûriers chez *M. indica* cv. mâle local, *M. alba* cv. LF2, *M. bombycis* cv. Schimonachi et Mizusawa et *M. rotundifolia* cv. Tonkin (Jain et coll., 1990).

Consolidation et transplantation des plants :

Des plantules de *M. nigra* avec 3 à 4 noeuds ont été acclimatées et transférées dans le sol (Yadav et coll., 1990). Ivanicka (1987) a utilisé des plants avec des racines de 30 à 35 mm de longueur pour qu'elles s'établissent sur le terrain. Le prétraitement des plants de *M. laevigata* à une température de 30° C, et une photopériode de 10 heures pendant 7 à 10 jours est une condition nécessaire pour réussir le transfert dans le sol (Islam et coll., 1993). Différents mélanges de terreau ont été testés : mélange humide composé de tourbe stérilisée à la vapeur et d'agropérlite (2:1), terre autoclavée, mélange de soilrite et de vermi-compost pour cultiver des plants de mûrier régénérés (Islam et coll., 1993 ; Ivanicka, 1987 ; Patel et coll., 1983 ; Pattnaik et coll., 1996 ; Pattnaik et Chand, 1997). Les plants sont irrigués avec une demi solution nutritive de Hoagland autoclavée et de l'eau pendant le processus de consolidation (Jain et coll., 1990 ; Islam et coll., 1993 ; Hossain et coll., 1992). Le taux de survie des plants acclimatés varie entre 75 % chez *M. nigra* (Yadav et coll., 1990) et 90 à 95 % chez *M. indica* (Jain et Datta, 1992), *M. lhou*, *M. cathayana*, *M. serrata* (Pattnaik et Chand, 1997) et *M. australis* (Pattnaik et coll., 1996).

Graines artificielles :

Bapat et coll., (1987) ont pour la première fois obtenu la production de graines artificielles en enfermant des bourgeons axillaires excisés provenant de pousses de *M. indica* élevées *in vitro* dans une matrice d'alginate de sodium. Des plants complets de *M. indica* ont été obtenus à partir de ces graines synthétiques dans des conditions *in vitro* et *in vivo* (Bapat et Rao, 1990a). L'alginate s'avère supérieur comme matrice pour enfermer les bourgeons axillaires d'espèces variées de mûrier (Bapat et coll., 1987 ; Bapat et Rao, 1990a, 1990b). L'utilisation de carbendenzim (fongicide) améliore la fréquence de production de plants chez *M. indica* (Bapat et Rao, 1990b). Machii (1992a) a enfermé des bourgeons adventifs provenant de cultures de feuilles immatures de *M. alba* dans une matrice d'alginate de sodium et obtenu cent pour cent de régénération des pousses dans un milieu MS additionné avec du BAP. Pattnaik et coll. (1995) ont trouvé que la matrice la mieux adaptée pour la production de graines synthétiques chez *M. multicaulis* var. Goshorami, *M. indica* var Kanva-2, S-1635, S-36 et *M. bombycis* var Kenmochi est de l'alginate de sodium à 4 % avec 75 mM de CaCl₂ 2H₂O. Le potentiel de germination de méristèmes enfermés dans des conditions *in vitro* et *in vivo* dépend du génotype.

Formation de bourgeons adventifs :

Des bourgeons adventifs ont été induits directement chez *Morus alba* sur des explants de cotylédons, de feuilles, d'hypocotyles et de sommets de pousses (Oka et Ohyama, 1978, 1981 ; Kim et coll., 1985). Le milieu de base MS enrichi avec 2 mg l⁻¹ de BA est plus efficace pour induire la formation de bourgeons sur des explants de feuilles chez *M. alba* (Kim et coll., 1985) comparé au milieu AE. L'histologie de la formation des bourgeons indique chez *M. alba* que les bourgeons des pousses se développent à partir de feuilles dont le bout de la nervure médiane est coupé. Ohyama et

Oka (1982) ont observé que le milieu MS avec des additions de 10mg l^{-1} de N-(2-chloro-4-Pyridyl)-N-Phénylurée (4PU) induit une formation de bourgeons adventifs aux sommets apicaux des portions d'hypocotyles chez *M. alba*. Le thidiazuran qui est de la cytokinine est très efficace pour induire la formation de bourgeons adventifs à partir d'explants de feuille de mûrier (Thin et Katagiri, 1994). L'efficacité d'induction de bourgeons adventifs à partir de feuilles de *Morus alba* var. cultivées dans un milieu MS liquide contenant 2mg l^{-1} de BAP est environ deux fois meilleure que la formation de bourgeons adventifs sur des cultures de feuilles dans un milieu MS de gélose solidifiée contenant la même quantité de BAP (Katigiri et Thin, 1994). Les pousses obtenues à partir d'extrémités de pousse cultivées de *M. alba* ont été racinées sur un milieu complété avec $0,001\text{mg l}^{-1}$ de NAA (Hayashi et Oka, 1995). La régénération complète du plant a été obtenue par la formation de pousses adventives à partir d'explants de feuilles de 12 variétés de mûrier dans un milieu additionné de cytokinine et de somatotropine (Wen et coll., 1990).

Formation de cals et organogénèse :

Narasimhan et coll., (1970) ont été les premiers à essayer la culture *in vitro* de bouts de jeunes rameaux en forme de pièce de monnaie dans la région cambiale chez *Morus alba*. La même année Ohyama (1970) et un peu plus tard Ghugale et coll., (1971) et Seki et coll., (1971) ont obtenu des cals à partir d'explants de racines et d'hypocotyles de *M. alba* dans un milieu MS complété avec 1mg l^{-1} de 2,4-D et de 2 ppm d'IAA et de NAA. Le milieu MS de base est un milieu efficace pour l'initiation de cals chez certains génotypes de mûrier (Narayan et coll., 1989 ; Jain et Datta, 1992 ; Sahoo et coll., 1997). Les cals de *M. alba* poussent vigoureusement après avoir fait une sous culture dans un milieu MS contenant du panthothénate de calcium (1,0 ppm) et de la biotine (0,1 ppm) (Narasimhan et coll., 1970). Seki et coll., (1971, 1974) ont souligné qu'il fallait une auxine dans le milieu pour induire la formation de cals chez *M. alba*. Des explants cultivés dans un milieu MS sans aucun régulateur de croissance ne peuvent pas initier de cals chez *M. alba* (Ghugale et coll., 1971). L'addition de cytokinines et d'autres additifs organiques tels que de l'hydrolysate de caséine, du lait de noix de coco et de sucres suivie par une sous culture périodique tend à faire pousser les cals de *M. alba* plus rapidement (Minamizawa et Hirano, 1973 ; Oka et Ohyama, 1973 ; Ohyama et Oka, 1976). Mhatre et coll., (1985) et Jain et Datta (1992) ont montré que l'induction de cals à partir de segments nodaux, de segments internodaux, de feuilles et de bourgeons axillaires de *M. bombycis* et de *M. indica* a besoin de pré-traitements avec de faibles niveaux de BAP ($0,5 - 2\text{mg l}^{-1}$) à des périodes différentes. Le pré-traitement des explants d'hypocotyles avec du BAP n'est pas essentiel pour induire la formation de cals chez *M. alba* (Kathiravan et coll., 1995, 1997). Les cals sont maintenus dans un milieu contenant du 2,4-D avec du BAP ou du Kn environ pendant 2 mois chez *M. alba* (Oka et Ohyama, 1976 ; Tewary et coll., 1989) et *M. indica* (Sahoo et coll., 1997).

La régénération des pousses à partir de cals de *M. alba* a été obtenue en premier par Narayan et coll., (1989) sur un milieu MS contenant $2,0\text{mg l}^{-1}$ de BAP. L'organogénèse à partir de cultures de cals a été observée chez *M. alba* dans un milieu LS contenant $0,5\text{mg l}^{-1}$ de NAA et $0,75\text{mg l}^{-1}$ de BA (Kathiravan et coll., 1995) chez *M. bombycis* sur un milieu MS contenant 8,9 mM de BAP (Jain et Datta, 1992) et chez *M. indica* dans un milieu MS enrichi avec $0,5\text{mg l}^{-1}$ de BA (Sahoo et coll., 1997). Le trait commun à ces protocoles pour induire la différenciation des pousses à partir de cultures de cals est l'utilisation de BAP dans le milieu. On observe que la capacité de formation de pousses venant de cals dépend de la source de l'explant utilisé pour l'initiation des cultures de cals (Sahoo et coll., 1997). Les segments internodaux sont de meilleurs explants pour le développement de la régénération de pousses des cultures de cals chez *M. bombycis* (Jain et Datta, 1992) et chez *M. indica* (Sahoo et coll., 1997) que les explants de feuilles et d'hypocotyles.

Le racinement des pousses s'obtient dans un milieu MS complété avec $0,5\text{mg l}^{-1}$ de NAA chez *M. alba* (Narayan et coll., 1989) avec 2,5 mM d'IBA chez *M. bombycis* (Jain et Datta, 1992) avec $0,75\text{mg l}^{-1}$ d'IBA chez *M. alba* (Kathiravan et coll., 1995) et avec $1,0\text{mg l}^{-1}$ d'IBA chez *M. indica* (Sahoo et coll., 1997). Un milieu MS dilué 2 fois sans auxines induit aussi le racinement mais les

racines sont fines et élançées comparées aux racines formées par des pousses cultivées dans un milieu complété avec de l'auxine (Sahoo et coll., 1997 ; Jain et Datta, 1992). Les plants racinés de *M. alba*, *M. bombycis* et *M. indica* sont transférés dans les champs

Les plants régénérés de *M. alba* varient par rapport à la plante mère et possèdent des feuilles épaisses, avec des internœuds courts et un type de ramification élevé (Narayan et coll., 1989) tandis que les plants régénérés de *M. indica* (Jain et Datta, 1992) et de *M. alba* (Kathiravan et coll., 1995 ; Sahoo et coll., 1997) ne présentent pas de changement de leurs caractéristiques morphologiques.

Embryogenèse somatique :

Il existe seulement deux rapports disponibles sur l'embryogenèse somatique chez le mûrier (Thinh et Katagiri, 1995 ; Shajahan et coll., 1995). Un milieu MS modifié comprenant des sels minéraux MS, des vitamines B5 et du thidiazuran ($0,1 - 2,0 \text{ mg l}^{-1}$) induit une formation d'embryon somatique directe sur l'hypocotyle et les explants de racines. Des structures ressemblant à un embryon en forme de cœur se forment à partir de cultures en suspension de cals d'hypocotyles de *M. alba* cv. MR2 dans un milieu fortifié avec $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ de 2,4-D et $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BA. Les embryons ne réussissent pas à se développer en embryons matures (Shajahan et coll., 1995).

Haploïdes :

Certains articles relatent une production réussie d'embryons haploïdes de mûrier à partir de cultures d'anthères et d'ovules (Sethi et coll., 1992 ; Sita et coll., 1991 ; Jain et coll., 1996). Katagiri (1989b) a obtenu des structures semblables à des embryons et à des organes à partir de cals de pollen de *M. alba* dans un milieu MS modifié contenant des sels MS, des vitamines B1 et $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ de BA et d'IBA (Katagiri et Modala, 1993). Sethi et coll., (1992) ont rapporté la production d'embryons de pollen directement à partir d'anthères de *Morus* sp var. Goshwerami cultivées dans un milieu MS contenant de l'IBA, du BAP, du Kn et de l'AgNO₃. Ces embryons ont germé et produit des pousses feuillues sans racines. Les pousses ont été multipliées et racinées pour obtenir des plants complets. Le prétraitement à froid des anthères de *M. indica* pendant 24 heures et leur culture consécutive dans un milieu Bourgin modifié complété avec $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de NAA, $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP et 8 % de saccharose entraîne la formation de cals haploïdes (Jain et coll., 1996). L'inclusion de PVP et d'un niveau de saccharose élevé diminue le brunissement des cals et encourage l'embryogenèse. Des études cytologiques sur les extrémités des racines dérivées de cals androgènes de *M. indica* montrent la présence d'un nombre diploïde de chromosomes ($n = 14$) pour 75 % des plaques métaphasiques examinées (Jain et coll., 1996).

Une étude a signalé la régénération de la plante haploïde gynogénique chez le mûrier (Sita et coll., 1991). Un groupe de 65 plants a été produit à partir de cultures d'ovaires. Ces plants ne survivent pas dans les champs.

Isolement et culture des protoplastes :

Les protoplastes de mûrier ont été isolés avec succès à partir de cultures de cals (Ohnishi et Kiyama, 1987a) et de cellules de mésophylles (Tewary et Lakshmisita, 1992 ; Katagiri, 1988). La culture de cal primaire donne un meilleur rendement en protoplastes que les cultures de cals secondaires de mûrier (Ohnishi et Kiyama, 1987b). Parmi les différentes combinaisons d'enzymes testées, les meilleurs résultats en termes de rendement en protoplastes sont obtenus avec l'utilisation de cellulase (2 %), de macerozyme (1 %) et de macérèse (0,5 %) (Tewary et Lakshmisita, 1992). Katagiri (1989a) a signalé la formation et la division de colonies de protoplasme de mésophylle chez *M. acidosa*. Des plantes complètes ont été obtenues à partir de cals initiés à partir de protoplastes de mésophylles de mûrier par organogenèse et embryogenèse somatique sur un milieu MS (Ming et coll., 1992). La fusion de protoplastes de mûrier est réussie en utilisant des fusogènes chimiques (Ohnishi et Kiyama, 1987b) et par électrofusion (Ohnishi et Tanabe, 1989). Il n'existe pas de rapport sur la régénération des plantes à partir de protoplasme amalgamé de mûrier.

Génie génétique :

Machii (1989) a pour la première fois isolé de l'ADN de feuilles de *Morus acidosa*. Cette méthode peut être employée pour l'évaluation RAPD (ADN polymorphique amplifié au hasard) / RFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction), qui à son tour peut être utilisée pour étudier la variabilité génétique du mûrier. Machii (1990) a transformé génétiquement des feuilles de mûrier (*Morus alba* L.) en utilisant une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 comme vecteur. Il a réussi à transférer un gène résistant à la kanamycine par le plasmide ti PB1121 dans les feuilles de mûrier. Les feuilles transformées sont positives au GUS.

Cryoconservation :

Les bourgeons végétatifs de *M. bombycis* ont été cryoconservés en pré-gelant des explants nodaux à -10°C ou -20°C et en les dégelant rapidement à 37°C et en pré-gelant des explants nodaux à -20°C ou -30°C et en les dégelant lentement à 0°C (Yakuwa et Oka, 1988). Les extrémités de pousses de mûrier cryoconservées et les bourgeons latéraux obtenus à partir de pousses de mûrier élevées *in vitro* ont été régénérés en plantes complètes (Niino, 1990 ; Niino et Oka, 1990 ; Niino et coll., 1992a; Ohnishi et Kobayashi, 1986). On a montré que les bourgeons d'hiver cryoconservés attachés à des morceaux de pousses produisent des plantes complètes (Niino et coll., 1991). Les extrémités des pousses de bourgeons d'hiver de mûriers cryoconservées dans de l'azote liquide ont été racinées et régénérées en plantes complètes (Niino et coll., 1992b).

CONCLUSION

Nous avons mis en lumière les expériences variées chez le genre *Morus* sp. (mûrier) à partir d'une littérature complète mais éparpillée qui existe sur la culture de tissus chez 12 espèces. La plupart des études sur la culture de tissus de mûrier traite seulement de la micropropagation, jusqu'à la formation du plant ou dans quelques cas jusqu'à la consolidation de ces plants.

L'aspect le plus important concernant les plantes obtenues par culture des tissus est leur performance sur le terrain et le rendement économique chez les plantes obtenues par bouturage. Cette revue sur différents aspects de la culture des tissus chez le mûrier laisse apparaître de grandes possibilités par rapport à certains aspects tels que la performance sur le terrain (valeur nutritionnelle) et la stabilité génotypique des plantes obtenues par culture des tissus quand on les compare aux plantes cultivées avec des méthodes conventionnelles, par embryogenèse somatique, par production haploïde, par production polyploïde, par production de plantes tolérantes au stress, par production de plantes génétiquement modifiées, par la mise au point de marqueurs moléculaires variés pour les traits agronomiques et par l'amélioration des plants de mûrier en utilisant des outils modernes de génétique moléculaire. Nous conseillons vivement que les recherches sur les cultures de tissus chez le mûrier soient orientées vers un but précis et fournissent des données quantitatives pour faire émerger des possibilités biotechnologiques en moriculture.

PHOTOSYNTHESIS FOR CROP IMPROVEMENT IN MULBERRY (*MORUS* SPP.) - A REVIEW

B.K. SINGHAL*, S. CHAKRABORTI, MALA V. RAJAN, A. SARKAR & R.K. DATTA

Laboratory of Mulberry Physiology, Central Sericultural Research & Training Institute,
Mysore - 570 008, India.

Keywords: Photosynthesis, crop improvement, mulberry.

INTRODUCTION

Photosynthesis is the basis for life as it drives the great cycles of CO₂ uptake and O₂ evolution. Each year, approximately 200 billion tons of carbon is removed from the atmosphere as carbon dioxide and incorporated into organic compounds of plants by the process of photosynthesis (Rabinowitch, 1945). Photosynthesis provides the ultimate energetic basis for the activities of all human and animal life on earth, because photosynthetically produced organic molecules, when oxidised in respiration can release the energy of the photons trapped during the original reduction of carbon dioxide. Photosynthesis, thus, is the major link between solar energy and life (Galston, 1992).

Plants ingest only about 2.6% of nitrogen and 0.31% of phosphorus from the soil compared to over 90% dry weight obtained through photosynthesis utilising CO₂ from air, water and sunshine (Russel, 1973). Photosynthesis is absolutely essential even for the incorporation of nitrogen and phosphorus. While increasing crop productivity using nutrients alone seems to have reached a plateau, an enormous scope for improving the yields through the photosynthetic route exists. The upper limit for maximum photosynthetic efficiency for terrestrial plants has been calculated to be of the order of 6.6% (Bassham, 1977), but most crop plants achieve photosynthetic efficiencies only of the order of 0.15 to 0.2% (Boardman, 1980) suggesting a possibility of increasing the rate many folds more and consequently their yields.

Hall and Long (1993) have indicated that efficiency of energy conversion is determined directly by the photosynthetic process and expresses the direct relationship between productivity and photosynthesis. Improvement in efficiency of energy conversion is the most attractive means of increasing the productivity and the economic yield. If this could be achieved, an increase in productivity without the increased inputs of fertilisers would be achieved.

Sericulture is an agro based industry and mulberry is the sole food plant for silkworms (*Bombyx mori* L.). Yield is not under direct genetic control, but, it is the multitude of physiological and biochemical plant processes which interacts to have an effect on yield. Genetic variations, weather and cultural practices and their interactions influence the physiological processes for controlling the growth and they ultimately affect the productivity. Unfavourable factors like drought, temperature, cultural practices, soil fertility, pest attack, etc. decrease the yield by affecting physiological processes of the plant. High yielding varieties possessing combinations of efficient physiological processes capable of producing higher yields are evolved by different breeding methods. In mulberry, though,

* Present address for correspondence: Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Miran Sahib, Jammu Tawi -181 101, Jammu & Kashmir State, India.

much work has been carried out on breeding aspects, the use of different packages and mulberry disease control in crop productivity, but no attention has been paid for exploiting the photosynthetic route for increasing the crop productivity. For exploring this basic way of mulberry improvement, the work carried out on mulberry photosynthesis by others and us is reviewed and the need for future studies is discussed.

GAS EXCHANGE TRAITS AND GENETIC VARIABILITY AMONG GENOTYPES UNDER IRRIGATED CONDITION

Genetic variation within a species for gas exchange traits has been reported in various crops (Krieg, 1983; Austin, 1989; Sasaki and Tshii, 1992; Leidi *et al.*, 1993; Sharma and Singh, 1994; Wada *et al.*, 1994; Chakraborti *et al.*, 1996a). In mulberry the photosynthesis and other gas exchange traits vary considerably. Among the ten promising mulberry genotypes studied under a tropical zone by us (Table I), the highest photosynthetic rate of $20.88 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ was recorded in S-13, while in the genotype S-36, the lowest photosynthetic rate was observed ($13.72 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Similarly, other gas exchange traits i.e. stomatal conductance, inter cellular CO_2 concentration and transpiration rate also varied significantly among the genotypes. Like photosynthesis, the genotype S-13 also revealed highest leaf yield of 417.81 g/plant . In the genotype S-36, though the photosynthetic rate was the lowest, the leaf yield was higher than the genotypes S-1, S-799 and local.

The ratio of photosynthesis 'A' to stomatal conductance 'Sc' often considered as a measure of water use efficiency at a single leaf level (Osmond *et al.*, 1980) also varies among ten genotypes. Water use efficiency was less in the genotypes S-1 and S-34, while it was found highest in Tr-10. A/Sc ranged from 19.16 to 29.49. Genotypic variation in 'A' per unit 'Sc' was proposed as a screening tool for gas exchange efficiency in cotton (Krieg, 1983; Radin *et al.*, 1988). Udaykumar *et al.*, (1998) stated that despite the realisation about the importance of water use efficiency (WUE) in crop improvement, the available genetic variability in this trait has not been successfully exploited through breeding. Selection for high WUE often resulted in decrease in crop growth rate (CGR) and they have pointed out that this was perhaps the most significant setback for further improvement in this trait. Many such attempts were not successful since improvement in WUE was often associated with reduced dry matter accumulation and yield (Matus *et al.*, 1995). This lack of success arises primarily due to a strong interdependency between transpiration 'Tr' and 'WUE'. Since 'WUE' and 'Tr' directly influence growth rates, interdependency between these traits is not desirable. Therefore, it is essential to identify types where this interdependency is lower. Sheshashayee *et al.*, (1996) have found a negative relationship between intercellular CO_2 conc./ stomatal conductance ratio and photosynthesis in sunflower and soybean and suggested $\text{I CO}_2/\text{Sc}$ ratio as a novel approach to estimate the mesophyll efficiency. Among ten mulberry genotypes studied by the authors, S-13 has revealed such a relationship and has a higher mesophyll efficiency compared to other genotypes as indicated by the highest photosynthetic rate and leaf yield while the lowest $\text{I CO}_2/\text{Sc}$ ratio in this genotype. However, the genotype Tr-10 has shown the highest A/Sc ratio, $\text{I CO}_2/\text{Sc}$ ratio as well as leaf yield. It is a triploid genotype reported to have C_4 photosynthetic syndrome. The genotype needs more detailed investigations for concrete conclusions.

Das *et al.*, (1994), while screening about 70 accessions, found that among Japanese varieties, Kairyo-roso possesses the highest photosynthetic rate of $17.43 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, while the variety Seizuro showed the lowest photosynthetic efficiency. Amongst Chinese accessions, the highest photosynthetic rate of $15.71 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ was recorded in the variety China Black. Evaluation of 32 Indian varieties revealed a high photosynthetic rate in Serpentina, Panjab local, Molai and Nayedgami. The varieties Mirgund-6, OPH-1 and MS-9 were found to have a low photosynthetic rate (Table II).

Table I. Genotypic variation in gas exchange parameters of ten promising mulberry genotypes under irrigated conditions.

Tableau I. Variation génotypique des paramètres d'échange de gaz de dix génotypes de mûrier prometteurs bénéficiant de l'irrigation.

Genotype	Photosynthetic rate	Stomatal conductance	Inter-cellular CO ₂ conc.	Transpiration rate	A/Sc (×100)	I CO ₂ /Sc	Leaf yield per plant
<i>Génotype</i>	<i>Taux de photosynthèse</i>	<i>Conductivité des stomates</i>	<i>Conc. intercellulaire en CO₂</i>	<i>Taux de transpiration</i>			<i>Rendement en feuilles par plante</i>
	($\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	($\text{mmoles m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	(ppm)	($\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$)			(g)
S-34	14.47	70.4	290.08	0.0080	20.55	4.12	404.95
S-13	20.88	89.0	282.69	0.0084	23.46	3.18	417.81
S-54	14.80	65.1	287.27	0.0074	22.73	4.41	401.74
RFS-135	14.56	59.0	260.99	0.0068	24.68	4.42	394.60
S-1	17.63	92.0	299.20	0.0099	19.16	3.25	370.31
Tr-10	16.25	55.1	282.49	0.0072	29.49	5.13	421.02
S-799	17.67	70.6	281.22	0.0077	25.03	3.98	308.53
S-36	13.72	63.1	281.99	0.0077	21.74	4.47	383.52
K-2	15.33	68.5	266.66	0.0078	22.38	3.89	372.46
Mysore local	15.70	65.0	279.59	0.0082	24.15	4.30	325.68
CD at 5%	0.92	19.1	14.76	0.0006			40.57

A = Photosynthetic rate / *Taux de photosynthèse.*

Sc = Stomatal conductance / *Conductivité des stomates.*

I CO₂ = Inter-cellular CO₂ concentration / *Concentration intercellulaire CO₂.*

Density of plantation = 60 × 60 cm between plant to plant and row to row /

Densité de plantation = 60×60 cm entre plant et entre rangée.

Table II. Photosynthetic rate ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in some exotic and Indian germplasm varieties.**Tableau II. Taux de photosynthèse ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) chez des variétés exotiques et indiennes.**

Variety	Photosynthetic rate
Variété	Taux de photosynthèse
Exotic / Exotiques	
Kairyo-roso (Japan / Japon)	17.43
Seijuro (Japan / Japon)	7.20
China Black-A (China / Chine)	15.71
China white (China / Chine)	10.40
Indian / Indiennes	
Serpentina	17.14
Panjab local	14.52
Molai	14.13
Nayedgami	14.00
Mirgund-6	1.17
OPII-1	1.28
MS-9	1.8

Das *et al.*, (1994)

Das and Setua (1997) found that in mulberry the higher yield of the cultivars is due to the efficient utilisation of $^{14}\text{CO}_2$ during photosynthesis. Their study establishes a strong positive correlation between the leaf photosynthesis and the yield potential of the crop.

Chakraborti *et al.*, (1997) found a significant correlation between mulberry leaf yield and the eleven characters shown in Tables III and IV. The most important parameters directly correlated with the leaf yield were the length of the longest shoot, the leaf area and the stem yield. However, as these morphological parameters were influenced by the physiological parameters like photosynthesis, water use efficiency and carotenoids, it was concluded that along with important morphological parameters, photosynthesis, water use efficiency and carotenoids should be considered for identifying efficient genotypes.

Table III. Correlation matrix.

Tableau III. Matrice de corrélation.

	Length of longest shoot	No. of shoots/ plant	Cumulative shoot length	Leaf area	Stem yield	Stem moisture	Chl. a/b	Carotenoids	Photo synthesis	Water use efficiency	Leaf yield
	<i>Longueur de la pousse la plus longue</i>	<i>Nbre de pousses/ plante</i>	<i>Longueur cumulative de la pousse</i>	<i>Surface de la feuille</i>	<i>Rendement en tiges</i>	<i>Humidité de la tige</i>	<i>Chloro- phyllé a/b</i>	<i>Caroténoides</i>	<i>Photo- synthèse</i>	<i>Efficacité d'utilisation de l'eau</i>	<i>Rendement en feuilles</i>
Length of longest shoot <i>Longueur de la pousse la plus longue</i>	1.000	0.43111*	0.88893**	-0.09174	0.82612**	0.07967	-0.08428	0.49649*	0.56004*	0.24686	0.34414*
No. of shoots per plant <i>Nbre de pousses par plante</i>		1.00000	0.75704**	-0.55792*	0.35890*	-0.34694*	-0.04590	0.23445	0.37919*	-0.36269*	0.18903
Cumulative shoot length <i>Longueur cumulative des pousses</i>			1.00000	-0.36713*	0.74882*	-0.18468	-0.03130	0.48993*	0.65343*	-0.00810	0.27516
Leaf area / <i>Surface de la feuille</i>				1.00000	0.3408*	0.55195*	0.05424	-0.19732	0.46558*	0.35396*	0.37829*
Stem yield / <i>Rendement en tiges</i>					1.0000	0.17324	-0.04662	0.48563*	0.41964*	0.35888*	0.48285*
Stem moisture / <i>Humidité de la tige</i>						1.00000	0.03570	-0.08929	-0.39745*	0.20961	0.12529
Chl. a/b / <i>Chlorophylle a/b</i>							1.00000	-0.38049*	-0.09358	-0.04571	-0.07570
Carotenoids / <i>Caroténoides</i>								1.00000	0.48251*	-0.06270	-0.07037
Photosynthesis / <i>Photosynthèse</i>									1.00000	0.16081	0.09186
Water use efficiency / <i>Efficacité d'utilisation de l'eau</i>										1.00000	0.19810
Leaf yield / <i>Rendement en feuilles</i>											1.00000

r = 0.306 at 5%

Chakraborti *et al.*, (1997)

Table IV. a value for different traits.

Tableau IV. Valeur de a pour différents caractères.

Variable	a value	Std. error	T-value
	Valeur a	Ecart type	Valeur-T
Length of longest shoot / Longueur de la pousse la plus longue	0.09366	0.0467	2.004
No. of shoots/ plant/ Nbre de pousses / plant	2.56021	0.9284	2.758
Cumulative shoot length / Longueur cumulative des pousses	-0.02630	0.0104	2.524
Leaf area / Surface de la feuille	0.00035	0.0001	4.666
Stem yield / Rendement en tiges	1.06911	0.2492	4.291
Stem moisture / Humidité de la tige	-0.15444	0.0983	1.571
Chl. a/b	-5.18713	2.8002	1.852
Carotenoids / Caroténoïdes	-3.26660	1.2351	2.645
Photosynthesis / Photosynthèse	0.34482	0.1156	2.982
Water use efficiency / Efficacité d'utilisation de l'eau	-0.00080	0.0005	1.778

 $R^2 = 0.5995$
Chakraborti *et al.*, (1997).

GAS EXCHANGE AND GENETIC VARIABILITY IN PROMISING MULBERRY GENOTYPES UNDER RAINFED CONDITION

Water shortage is the primary constraint to plant growth and productivity over much of the land surface (Kramer, 1983). In India, much of the land is under poor, erratic rainfalls and extreme evaporation. Crop failures occurring on an average once in four years in semi arid areas, are difficult to predict (Swindale and Bidinger, 1981). Even in most humid regions, droughts often decrease yields substantially (Lawlor and Uprety, 1993). The full potential of mulberry can not be exploited because of the limitations in physiological and biochemical processes imposed by water stress. Photosynthetic rate and other related gas exchange parameters are bound to decrease during any environmental stress and in mulberry the photosynthetic organ i.e. leaf itself is the economic yield. Chakraborti *et al.*, (1996 b) noted significant positive correlation between the number of leaves per plant and the photosynthetic rate with leaf yield under rainfed condition. The two main causes of loss of production under water stress are the reduction in the crop leaf area and the lower rates of photosynthesis per unit leaf area (Jordan and Ritchie, 1971; Legg *et al.*, 1979; Zelitch, 1982; Fereres, 1985; Kriedmann, 1986; Day

al., 1987; Leidi *et al.*, 1993; Ramanujam *et al.*, 1997; Singhal and Roopa, 1998). The depression in photosynthetic rate under water stress has been reported in different agricultural crops (Srinivasa Rao and Bhatt, 1990; Chaves, 1991; Bose and Ghosh, 1995). Gas exchange parameters in 10 promising mulberry genotypes grown in a tropical zone of India, the major silk producing zone of the country, revealed a severe depression in the photosynthetic rate under rainfed condition (Table V) as compared with the irrigated condition (Table I). Genotype S-13 which has shown the highest rate of photosynthesis ($20.88 \mu \text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under irrigated condition has shown almost lowest photosynthetic rate ($8.84 \mu \text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under rainfed condition. The genotype RFS-135 maintains almost the same photosynthetic rate under both, irrigated and rainfed conditions. However, the photosynthetic rate did not significantly vary, among the genotypes under rainfed condition. A negative relationship was also noted between 'A' and I CO₂/Sc ratio.

Table V. Genotypic variation in gas exchange parameters of ten mulberry genotypes under rainfed condition.

Tableau V. Variation génotypique des paramètres d'échange de gaz de dix génotypes de mûrier arrosés par la pluie.

Genotype	Photosynthetic rate	Stomatal conductance	Intercellular CO ₂ conc.	Transpiration rate	A/Sc (×100)	I CO ₂ /Sc
Génotype	Taux de photosynthèse ($\mu \text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Conductivité des stomates ($\text{m} \mu \text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Conc. intercellulaire CO ₂ (ppm)	Taux de transpiration ($\mu \text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
S-34	6.18	20.1	249.64	0.0090	30.75	12.42
S-13	8.84	22.7	246.47	0.0100	38.94	10.86
S-54	7.44	20.6	252.39	0.0130	36.12	12.25
RFS - 135	13.62	26.0	246.59	0.0140	52.38	9.48
S-1	11.78	28.2	233.90	0.0120	41.77	8.29
Tr-10	12.92	28.8	253.33	0.0140	44.86	8.80
S-799	12.04	25.5	240.71	0.0120	47.21	9.44
S-36	9.13	24.0	257.00	0.0130	38.04	10.71
K-2	12.64	31.6	255.12	0.0114	40.00	8.07
Mysore local	9.24	24.7	252.39	0.0390	37.41	10.22
CD at 5%	4.42	NS	2.89	0.0021		

A = Photosynthetic rate / Taux de photosynthèse. Sc = Stomatal conductance / Conductivité des stomates.

I CO₂ = Intercellular CO₂ concentration / Concentration intercellulaire CO₂

Density of plantation = 90 × 90 cm between plant to plant and row to row / Densité de plantation = 90 × 90 cm entre plant et entre rangée.

Table VI. Reduction in photosynthetic rate in popular mulberry varieties during loss of leaf water content under different water stress levels.

Tableau VI. Réduction du taux de photosynthèse chez des variétés de mûrier populaires pendant la perte de teneur en eau de la feuille à différents taux de stress hydrique.

	Leaf water content (%)			Photosynthesis ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			Reduction in photosynthetic rate (%)		
Treatment	Variety			Variety			Variety		
	<i>Teneur en eau de la feuille (%)</i>			<i>Photosynthèse ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)</i>			<i>Baisse du taux de photosynthèse (%)</i>		
Traitement	Variété			Variété			Variété		
	K-2	S-13	V-1	K-2	S-13	V-1	K-2	S-13	V-1
T-1	409.05	349.51	421.91	17.39	16.24	15.44	nil		
T-2	384.38	326.96	357.78	13.76	13.11	13.48	20.87	19.25	12.69
T-3	341.23	294.22	325.25	11.31	12.04	10.30	34.96	25.86	33.29
T-4	320.56	276.32	274.78	9.52	8.50	8.81	44.92	47.60	42.94
T-5	280.72	244.76	244.25	5.21	5.11	6.48	70.04	68.45	58.03
CD at 1%									
Var	7.69			0.243					
Treat / Trait.	9.93			0.314					
V×T	17.20			0.544					

T-1, T-2, T-3, T-4 and T-5 are the irrigations provided once in 3, 6, 9, 12 and 15 days respectively / T-1, T-2, T-3, T-4 et T-5 sont les irrigations fournies tous les 3, 6, 9, 12 et 15 jours respectivement.

Singhal and Roopa (1998).

Under a pot culture experiment, three popular varieties i.e. K-2, S-13 and V-1 have shown a steep fall in the photosynthetic rate under water stress condition (Table VI). The maximum 70.04% fall in the photosynthetic rate was noted in the variety K-2 grown under a continuous water stress of 15 days. Water stress for more than 15 days caused the death of mulberry plants (Singhal and Roopa, 1998). Das and Misra (1996) screened seven important drought tolerant mulberry varieties of Eastern India and recorded a high photosynthetic rate ($17.35 \mu\text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), leaf yield (3983.48 kg/ha) and water use efficiency in the variety S-1730 as compared to the varieties S-1, SV-1, S-1531, S-13, S-34 and S-1635 (Table VII). Misra *et al.*, (1996) have evaluated fifteen mulberry varieties i.e. S-1, C-1730, C-763, C-776, C-1733, C-1726, C-1729, C-1614, C-1690, S-799, S-1708, S-1608, S-1635, TR-4, and TR-10 with a view to select a suitable drought tolerant strain. They found the variety C-1730 maintaining the highest photosynthesis, plant water use efficiency and leaf yield under natural drought

prone area of Purulia district, West Bengal (East India). C-1729 was found to be the most sensitive variety. Lawlor and Upreti (1993) have summarised the causes of decreased photosynthesis to water stress leaves. Effects of stress was explained by a mechanism based on: decreased stomatal conductance, increased ionic concentration (particularly Mg^{2+}) of the chloroplast stroma, progressive inhibition of ATP synthesis by the CF_0 - CF_1 enzyme due to increased magnesium concentration, maintenance of relatively higher rates of electron transport and reduction of pyridine nucleotides and little change in the enzyme components of photosynthesis and their characteristics. If the effects on metabolism are much, the photosynthetic system breaks down irreparably. Effect on soybean ribulose biphosphate carboxylase activity and canopy photosynthetic rates have also been noted by Vu *et al.*, (1987) due to drought stress and elevated CO_2 .

Table VII. Gas exchange parameters of drought tolerant mulberry varieties at natural drought prone area of East India.

Tableau VII. Paramètres d'échange de gaz de variétés de mûrier tolérant la sécheresse dans une zone sujette à la sécheresse dans l'est de l'Inde.

Variety	Photosynthesis	Leaf yield	Physiological water use efficiency (mole of CO_2 / mole of H_2O transpired)
<i>Variété</i>	<i>Photosynthèse</i>	<i>Rendement en feuilles</i>	<i>Efficacité d'utilisation de l'eau physiologique (mole de CO_2/ mole de H_2O transpiré)</i>
	($\mu moles\ m^{-2}\ s^{-1}$)	(kg/ha)	
S-1	5.43	3793.73	563.33
SV-1	9.78	2997.72	337.33
S-1531	8.28	2855.49	263.00
S-13	12.38	3356.10	419.33
S-34	14.27	3547.64	525.00
S-1635	11.64	3084.74	386.00
S-1730	17.35	3983.48	631.00
C/D at 5%	2.19	277.00	90.10

Das and Misra (1996).

PHOTOSYNTHESIS UNDER WATER LOGGING CONDITION

The water logging condition lowers soil temperature and inhibits roots respiration due to O₂ deficiency. It causes decrease in oxidation-reduction potential in soil and some noxious compounds are accumulated. Roots become poisoned due to toxic compounds. The activities of aerobic bacteria gets inhibited which influences decomposition of soil organic matter. Das and Setua (1997) evaluated seven mulberry varieties i.e. Jatinuni, Kanva-2, Koliakotai, S-1635, S-1, Malda-local and Kolitha-3 for their tolerance to water logging (provided at 30 cm level for 10 days duration) condition. Photosynthetic rate and leaf yield were drastically reduced in all the varieties under water logging condition (Table VIII). The varieties S-1635, S-1 and Malda-local were found affected more under water logging condition. Kolitha-3 was the least affected variety. A retardation in water logging effects was noted by the use of kinetin based plant growth regulators.

Table VIII. Effect of water logging on photosynthetic rate and leaf yield of some mulberry varieties under Eastern India condition.

Tableau VIII. Effet de l'excès d'eau sur le taux de photosynthèse et le rendement en feuilles de certaines variétés de mûrier dans les conditions de l'est de l'Inde.

Variety	Photosynthesis ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Leaf yield (kg/ha/crop)	
	Control	Water Logging	Control	Water Logging
	<i>Photosynthèse ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)</i>		<i>Rendement en feuilles (kg/ha/récolte)</i>	
<i>Variété</i>	<i>Témoin</i>	<i>Excès d'eau</i>	<i>Témoin</i>	<i>Excès d'eau</i>
Jatinuni	7.73	5.80	2932.0	2225.5
Kanva-2	10.47	8.40	4302.0	3662.2
Koliakotai	14.41	9.76	2674.0	2598.0
S-1635	14.83	6.15	6960.6	6224.6
S-1	16.58	10.08	6618.3	5511.8
Malda-local	14.05	6.13	4358.7	3733.9
Kolitha-3	10.49	9.15	3265.8	2977.4
CD at 5%				
Variety / <i>Variété</i>	1.140		118.17	
Treatment / <i>Traitement</i>	0.611		63.16	
V × T	1.616		167.12	

Das and Setua (1997).

PHOTOSYNTHETIC INCORPORATION OF $^{14}\text{CO}_2$ IN EXOTIC AND INDIAN VARIETIES

Chakraborti (1993) has studied some of the exotic mulberry varieties i.e. Moretti Seringe, Morettiana, Ichinose, China white and Goshyoerami for total photosynthetic ^{14}C incorporation. Considerable variation was found in $^{14}\text{CO}_2$ fixation rates irrespectively of the basis (chlorophyll, leaf area and fresh weight). ^{14}C incorporation in Morettiana and Ichinose was found to be somewhat higher than the other varieties (Table IX). The distribution of photosynthetically fixed ^{14}C into alcohol soluble and alcohol insoluble fractions revealed that the variety Ichinose and Morettiana had a higher incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ into both, alcohol soluble and alcohol insoluble fractions as compared to other four varieties (Table X). Photosynthates found were more or less the same in all the varieties. Chakraborti (1993) further stated that a significant amount of malate and aspartate reveals an intermediate pathway between C_3 and C_4 in mulberry.

Table IX. Apparent photosynthetic efficiency of different varieties of mulberry.

Tableau IX. Efficacité photosynthétique apparente de différentes variétés de mûrier.

Varieties	Photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ incorporation (CPM $\times 10$)		
	/mg chlorophyll	/cm ² leaf area	/mg fresh tissue
Variétés	Incorporation de $^{14}\text{CO}_2$ photosynthétique (CPM $\times 10$)		
	/mg chlorophylle	/cm ² de surface de feuille	/mg de tissu frais
Moretti seringé	2715.0	331.0	21.0
Morettiana	6046.0	1550.2	98.2
Ichinose	11291.0	1551.0	95.0
China white	7151.0	780.4	46.7
Goshyoerami	4171.0	768.0	52.7

Age of the plant - 1 year, $^{14}\text{CO}_2$ concentration 50 $\mu\text{ci ml}^{-1}$, specific activity 47.6 $\mu\text{ci m mole}^{-1}$, and light intensity 6000 lux

Age de la plante - 1 an, concentration $^{14}\text{CO}_2$ 50 $\mu\text{ci ml}^{-1}$, activité spécifique 47,6 $\mu\text{ci m mole}^{-1}$ et intensité de lumière de 6000 lux.

Chakraborti (1993)

Table X. Incorporation of ^{14}C into alcohol soluble (AS) and alcohol insoluble (AIS) fractions in different varieties of mulberry.*Tableau X. Incorporation de ^{14}C dans des fractions solubles à l'alcool (AS) et insolubles à l'alcool (AIS) chez différentes variétés de mûrier.*

Varieties / Variétés	CPM/ mg fresh tissue/ CPM/ mg de tissu frais		
	AS	AIS	AS:AIS ratio Rapport AS : AIS
Moretti seringe	508.0	253.5	3.8:1
Morettiana	2120.3	1435.0	2.6:1
Ichinose	1540.5	8706.5	0.9:1
China white	902.6	1945.5	1.0:1
Goshyoerami	725.0	927.0	2.0:1

Age of the plant - 1 year, $^{14}\text{CO}_2$ concentration $50 \mu\text{Ci ml}^{-1}$, specific activity $47.6 \mu\text{Ci mmole}^{-1}$, and light intensity 6000 lux / Age de la plante - 1 an, concentration $^{14}\text{CO}_2$ $50 \mu\text{Ci ml}^{-1}$, activité spécifique $47.6 \mu\text{Ci mmole}^{-1}$ et intensité de lumière de 6000 lux.
Chakraborti (1993).

Das *et al.*, (1997) studied the photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation capacity in fifteen Indian evolved and exotic mulberry varieties i.e. Kajli, Bombay local, S-1, S-799, C-763, S-54, Tr-10, S-1635, C-1730, BC2-59, China white, Kosen, Kanva-2, Goshyoerami and Ichinose, using radio actively labelled $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. The apparent photosynthesis found by them was significantly higher in the triploid cultivars Tr-10, S-1635 and C-1730 than in S-799, C-763, S-54 and Kanva-2 considered as high yielding cultivars. They have also found a positive correlation of photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation rate with the chlorophyll content except in S-1. Goshyoerami among the exotic varieties was found with more photosynthesis. They have reported that a greater amount of ^{14}C incorporation was registered in malic and aspartic acid, the four carbon compounds in triploid cultivars. The ratio of C₃/C₄ compound was also below unity, indicating the dominance of C₄ dicarboxylic acid compounds (Table XI). Phosphoenolpyruvate carboxylase, was more active in the triploid varieties than ribulose 1,5-biphosphate carboxylase, which strongly suggests the possibility of occurrence of a more efficient C₄ photosynthetic syndrome in mulberry genotypes. They have suggested, that, it can be utilised profitably for screening efficient cultivars for future breeding programmes.

In 10 mulberry genotypes i.e. S-34, S-13, S-54, RFS-135, S-1, Tr-10, S-799, S-36, K-2 and local, studied by the senior author, the distribution of photosynthetically fixed ^{14}C into alcohol soluble and alcohol insoluble fractions revealed higher incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ into, both, alcohol soluble and alcohol insoluble fractions in the genotypes S-13 and S-799 as compared to other genotypes (Table XII). Chromatographic resolution of the alcohol soluble fraction revealed significant differences in the labelling pattern of ^{14}C among the genotypes. Among sugars, sucrose was the most abundantly labelled compound, and, more in the genotype S-13.

Table XI. Changes in the level of two photosynthetic enzymes isolated from the seventh leaf (from the tip) of five mulberry cultivars.

Tableau XI. Changements du niveau de deux enzymes photosynthétiques isolées à partir de la septième feuille (à partir du haut) chez cinq cultivars de mûrier.

Mulberry cultivars	C3/C4 ratio	CPM. mg ⁻¹ protein		PEP carboxylase/ RuBP carboxylase ratio
		RuBP carboxylase	PEP carboxylase	
<i>Cultivars de mûrier</i>	<i>Rapport C3/ C4</i>	<i>CPM / mg⁻¹ de protéine</i>		<i>Rapport PEP Carboxylase / RuBP Carboxylase</i>
		<i>RuBP Carboxylase</i>	<i>PEP Carboxylase</i>	
Kajli	1.0127	19.75	130.50	6.607
Tr-10	0.7434	59.35	733.80	12.364
S-1635	0.6832	65.75	736.50	11.201
BC ₂ -59	1.0373	24.50	134.50	5.489
S-799	1.9390	15.50	20.50	1.322
Pea / Pois (C3 plant)		977.43	678.34	0.694
Maize / Maïs (C4 plant)		4.34	79.64	18.346

Das *et al.*, (1997).

Malic and succinic acid were also reasonably labelled, and, were found more in S-13. Incorporation in alanine, tyrosine and serine was higher in all the genotypes. But aspartic and glutamic acid levels were higher in S-13 and S-1.

PHOTO AND DARK RESPIRATION IN MULBERRY

Due to photorespiration, the C₃ species, when grown under normal atmospheric conditions, loses as much as 40% of net CO₂ assimilated (Zelitch, 1992). Its relative magnitude depends upon species, temperature, light intensity and other factors.

The photo (L) and dark (D) respiration rates were studied in ten mulberry genotypes i.e. S-34, S-13, S-54, RFS-135, S-1, Tr-10, S-799, S-36, K-2 and Mysore local, using radioactively labelled NaH¹⁴CO₃. The lowest photorespiration rate as well as L/D ratio were found in the genotype S-13, followed by S-799 (Table XIII). The genotype S-13, thus, has a high photosynthetic rate with less photorespiration. As indicated earlier, this genotype has also shown a higher incorporation of ¹⁴CO₂

into, both, alcohol soluble and alcohol insoluble fractions which has also yielded the highest leaf yield among the genotypes studied.

Zelitch (1992) has suggested the regulation of photorespiration by following ways for controlling plant productivity.

1. Change the characteristics of the enzyme, so that, the affinity of RuBISCO for CO₂ will be greater with relatively less oxygenation.

2. Compartmentation in plants that partially regulate photorespiration, occur in some species known as the C₃ - C₄ intermediates.

3. Selection for oxygen-resistant photosynthesis.

4. Enhancing catalase activity in the mutants.

5. Cloning the catalase gene and the production of transgenic plants with different levels of catalase activity.

Table XII. ¹⁴C activities in alcohol soluble (AS) and alcohol insoluble (AIS) fractions in promising mulberry genotypes.

Tableau XII. Activités ¹⁴C dans des fractions solubles à l'alcool (AS) et insolubles à l'alcool (AIS) chez des génotypes de mûrier prometteurs.

Genotype	CPM × 10 ⁻³		
	AS	AIS	AS:AIS
S-34	22.46	28.79	0.78
S-13	62.01	28.36	2.19
S-54	28.10	16.31	1.72
RFS-135	25.97	13.74	1.89
S-1	30.77	15.54	1.98
Tr-10	42.52	22.26	1.91
S-799	49.75	24.15	2.06
S-36	25.53	22.88	1.11
K-2	27.44	14.22	1.93
Mysore local	22.85	23.19	0.98

¹⁴CO₂ concentration 100 µCi, specific activity 50 µCi/m mole, light intensity 8000 lux.

Concentration ¹⁴CO₂ : 100 µCi, activité spécifique : 50 µCi/m mole, intensité de lumière : 8000 lux.

Table XIII. Genotypic variation in photo and dark respiration of ten promising mulberry genotypes. (Release of $^{14}\text{CO}_2$ from the leaf discs loaded with $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ photosynthetic products in light and dark).

Tableau XIII. Variation génotypique de la photo respiration et de la respiration à l'obscurité de dix génotypes de mûrier prometteurs (Libération de $^{14}\text{CO}_2$ des disques de feuille chargés en produits photosynthétiques $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ à la lumière et à l'obscurité).

Genotype	$^{14}\text{CO}_2$ liberated (cpm $\times 10$)/mg fresh leaf tissue)		
	$^{14}\text{CO}_2$ libéré (cpm / mg de tissu de feuille frais $\times 10$)		
	Photo (L)	Dark / Sombre (D)	L/D ratio Rapport L/D
S-34	34479.33	32115.00	1.07
S-13	33191.67	57268.33	0.58
S-54	68551.33	54888.33	1.25
RFS -135	43459.33	42990.33	1.01
S-1	47390.67	48908.00	0.97
Tr-10	40719.67	44773.00	0.91
S-799	77077.00	117460.00	0.66
S-36	47819.67	44726.00	1.07
K-2	53406.67	53309.33	1.00
Mysore local	37286.00	53449.33	0.70
CD at 5%	2166.14	1812.18	

Oliver and Zelitch (1977) found that glyoxylate treatment doubles net photosynthetic CO_2 fixation in tobacco leaf discs because of the inhibition in glycolate synthesis by glyoxylate which results in decreased photorespiration. Sengupta (1988) noted an increase in photosynthetic CO_2 incorporation in wheat leaf with increased CO_2 concentration, resulting in a decrease in photorespiration.

LEAF SURFACE OF MULBERRY - SEM APPROACH

The leaf surface determines mulberry's adaptation to different environments and exchange of water vapour, CO₂ and O₂ through stomatal pores. The hairy cover of the trichomes on epidermis determines the epidermal transpiration and the energy budget of the leaves. A dense pubescence of plant trichomes changes the optical properties of the leaf surface and may reflect or absorb certain wavelengths of light (Southwood, 1986). The stomata are controlling assimilation and transpiration through the size of the stomatal pores, hence, stomata play a vital role in controlling the balance between water loss and carbon gain i.e. biomass production. Singhal *et al.*, (1999 d) investigated ten mulberry genotypes i.e. Tr-10, K-2, S-36, S-54, S-1, V-1, Mysore local, S-13, S-34 and RFS-135 under scanning electron microscope for stomatal size and number, idioblasts and trichomes. Based on the size and number, stomata were grouped into 3 categories. The largest size of stomata ($13.251 \pm 0.005 \mu\text{m}$ length and $5.527 \pm 0.008 \mu\text{m}$ width) were found in the genotype Tr-10 but were least in number (3-4 stomata) in an area of $1333.2 \mu\text{m}^2$ among 10 promising genotypes. The genotype S-13, which has shown the highest photosynthetic rate of $20.88 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ among 10 genotypes, was found with smallest stomata ($8.034 \pm 0.004 \mu\text{m}$ length and $4.751 \pm 0.007 \mu\text{m}$ width) but were moderately higher in number (5.90 ± 0.22 per $1333.2 \mu\text{m}^2$ area). In all 10 genotypes studied, trichomes found were glandular. The genotype S-13 having the highest 'A' was found with very small trichomes having the length of $18.24 \pm 0.32 \mu\text{m}$. The relationship between the leaf surface and photosynthesis in mulberry needs investigations.

LEAF FORMS, LIGHT INTERCEPTION AND PHOTOSYNTHESIS

Smith *et al.*, (1997) explained that numerous leaf structural parameters influence the whole leaf photosynthesis through effects on light capture at the leaf surface, as well as via its propagation and attenuation within the leaf. These structural adaptations are strongly linked to leaf orientation and to the total sunlight incident on both leaf surfaces (Table XIV, fig. 1). The evolution of greater leaf thickness in sun leaves and corresponding structural asymmetry according to leaf inclination is strong evidence that, both, leaf orientation and structure influence the light and carbon dioxide processing at the whole leaf level. In the case of a characteristically thin shade leaf, light, and not CO₂ supply, is the primary limitation to photosynthesis. This optimum zone of light and CO₂ overlap may be broader and closer to the centre of the leaf.

Ten promising mulberry genotypes i.e. S-34, S-13, S-54, RFS-135, S-1, Tr-10, S-799, S-36, K-2 and Mysore local have horizontal or vertical leaf orientation with morphology of small cylindrical or large laminar broad leaf. The leaves of S-13 are comparatively thicker than all the genotypes and having the highest number of leaves per plant (about 288), though the size was less. Internodal distance is also significantly less. Leaves orientation is horizontal in this genotype. No information is available on the relationship between leaf orientation and photosynthetic rate in mulberry.

Ito (1995) found that under Japan conditions a densely planted mulberry population are more productive at earlier growth stages because the foliage are uniform and can intercept more light. However, in later stages, populations become less productive and severe defoliation occur because of low light into lower layers due to narrow row space. Ito concluded that higher productivity of densely planted mulberry population is attributed to the better light intercepting condition at earlier growth stages, and therefore, shoots must be pruned early in densely planted population to avoid the over luxuriant growth condition. The early pruning in densely planted population, if done at the proper height, not only stops over-luxuriant growth but also improves light intercepting condition, which leads to considerable increase in CO₂ assimilation. A proportional relationship has also been noted in mulberry field between intercepted solar radiation and dry matter production (Aqueel, 1999).

Table XIV. Influence of incident sunlight and stress level of the habitat on leaf orientational and structural characteristics and photosynthetic potential in 234 species (86 families of native plants (sampled predominantly from five Western Australia communities).

Tableau XIV. Influence de la présence de la lumière solaire et du niveau de stress de l'habitat sur les caractéristiques d'orientation et de structure de la feuille et sur le potentiel photosynthétique chez 234 espèces (86 familles) de plantes natives (prélevées en majeure partie à cinq endroits dans l'ouest de l'Australie).

Leaf form <i>Forme de la feuille</i>	Environmental conditions / <i>Conditions environnementales</i>			
	High sun ^a Low stress ^b <i>Soleil élevé^a Peu de stress^b</i>	High sun High stress <i>Soleil élevé Stress élevé</i>	Low sun Low stress <i>Soleil bas Peu de stress</i>	Low sun High stress <i>Soleil bas Stress élevé</i>
Orientation	Horizontal <i>Horizontale</i> tracks the sun <i>recherche le soleil</i>	Vertical or cylindrical Avoids the sun <i>Verticale ou cylindrique Evite le soleil</i>	Horizontal <i>Horizontale</i>	Horizontal <i>Horizontale</i>
Top to bottom ratio of incident light <i>Rapport haut / bas de la lumière incidente</i>	>3.5 ^c	< 2.0	< 3.5	2.5-3.5
Thickness (mm) <i>Épaisseur (mm)</i>	> 600	400-600	< 400	< 300
Thickness to width ratio <i>Rapport épaisseur largeur</i>	< 0.1	> 0.1	< 0.1	> 0.1
Morphology <i>Morphologie</i>	Large laminar broad leaf <i>Grande feuille large laminaire</i>	Small and cylindrical <i>Petite et cylindrique</i>	Large laminar broad leaf <i>Grande feuille large laminaire</i>	Small linear or laminar broad leaf <i>Feuille petite et linéaire ou laminaire</i>
	Hypostomatous and amphistomatous ^d <i>Hypostomateuse et amphistomateuse^d</i>	Amphistomatous <i>Amphistomateuse</i>	Hypostomatous <i>Hypostomateuse</i>	Hypostomatous <i>Hypostomateuse</i>
	Structures to protect abaxial stomata, no bicoloration <i>Structures pour protéger les stomates désaxés, sans bicoloration</i>	No bicoloration <i>Sans bicoloration</i>	Bicoloration <i>Bicoloration</i>	Weak bicoloration <i>Bicoloration faible</i>

Table XIV. (Continued).

Tableau XIV. (Suite).

Leaf form Forme de la feuille	Environmental conditions / Conditions environnementales			
	High sun ^a Low stress ^b	High sun High stress	Low sun Low stress	Low sun High stress
	Soleil élevé ^a Peu de stress ^b	Soleil élevé Beaucoup de stress	Soleil bas Peu de stress	Soleil bas Beaucoup de stress
Anatomy	Upper palisade layers	Upper and lower palisade layers	Single or no palisade layer	No palisade layer
Anatomie	Couches palisadiques supérieures	Couches palisadiques supérieures et inférieures	Une ou pas de couche palisadique	Pas de couche palisadique
Maximum photosynthetic potential ^c Potentiel photosynthétique maximum	1	2	3	4

a. Daily incident sunlight values compared over a 12-hour day were considered 'high' if photosynthetically active radiation (PAR) was over $10 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (as measured by a horizontal sensor) and 'low' if PAR was less than $10 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

a. Les valeurs de l'incidence du soleil comparées pendant un jour de 12 heures sont considérées « élevées » si la radiation photosynthétiquement active (PAR) est supérieure à $10 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (mesurée par un détecteur horizontal) et faibles si PAR est inférieure à $10 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

b. Stress was considered 'high' if annual precipitation was less than 7cm and 'low' if it was greater than 10 cm
b. Le stress est considéré 'élevé' si les précipitations annuelles sont inférieures à 7 cm et 'faible' si elles sont supérieures à 10 cm.

c. All values indicated for each category are rounded off to the nearest significant figure (e.g. to the nearest 100 for leaf thickness).

c. Toutes les valeurs indiquées pour chaque catégorie sont arrondies au chiffre supérieur le plus significatif (par ex. à 100 pour l'épaisseur de la feuille).

d. Leaves were classified as hypostomatous if more than 70% of the total leaf stomata were on the leaf underside, otherwise, they were classified as amphistomatous

d. Les feuilles sont classifiées hypostomateuses si plus de 70 % de l'ensemble des stomates des feuilles sont sur le dessous de la feuille, autrement elles sont classifiées amphistomateuses.

e. Relative ranking: 1 is greatest and 4 is least / Classement de rang: 1 est le plus grand et 4 le plus petit.

Smith et al. (1997).

INFLUENCE OF PACKAGE OF PRACTICES AND PLANT GROWTH REGULATORS ON LEAF PHOTOSYNTHESIS

The effect of different packages on photosynthesis is studied on two most popular mulberry varieties i.e. V-1 and S-36 for finding out an ideal package having a high photosynthetic rate and leaf yield. The highest photosynthetic rate of $23.42 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ was recorded in the package of Indo-Japanese system of spacing 'IJS' ($90 \times 180 \times 60 \text{ cm}$) in the variety V-1. In the same variety photosynthetic rate of $22.36 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ was achieved in the package where nitrogen and phosphorus fertilisers were curtailed by 50% and 75%, respectively, and substituted with 20 kg bacterial biofertilizer per ha/yr + Va mycorrhiza + n-triacontanol spray under 'IJS' of spacing (Table XV). Similarly, the 'A'/Sc ratio was almost the same in both the conditions. ICCO_2/Sc ratio was lowest in later case reflects mesophyll tissue efficiency in this package. However, the genotype S-36 revealed a high photosynthetic rate in the Indian system of package ($60 \times 60 \text{ cm}$ spacing) and 300:120:120 Kg of N, P and K fertilisers application/ha/yr.

Hence, more light interception and application of biofertilizer + VAM + triacontanol have remarkably influenced the photosynthetic rate in the variety V-1 under very low N and P applications, but, not in S-36. The study indicates that the package of practices is specific to the variety and a common package can not be followed, as the plants type and genetic potentiality for absorption and conversion differ.

Plant hormones or regulators are involved in the regulation of physiological development by their action at the site of production and also by their transport to other sites. These activities can influence photosynthesis. Ries *et al.*, (1977) have isolated a crystalline substance from the active fraction of alfalfa meal. It has increased the dry weight and water uptake of rice seedlings when sprayed over the foliage or applied in nutrient culture. The substance found was 'triacontanol'. Eriksen *et al.* (1981) observed that the difference in the response of C_3 and C_4 plants to triacontanol indicate that it regulates processes related to photosynthesis. Menon and Srivastava (1984) reviewed the importance of increasing plant productivity through photosynthetic route by using higher chain aliphatic alcohols.

The experiments on the use of plant growth regulators revealed a significant increase of the photosynthetic rate ($11.8 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in Planofix sprayed plants of mulberry variety S-1, followed by Biozyme crop+, Miraculan and Vipul, as compared to $8.6 \mu \text{ mole m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in control (Das and Setua, 1994). Similarly, the increase in leaf yield of 34, 28, 20 and 8% were recorded in plants sprayed with Planofix, Biozyme, Miraculan and Vipul, respectively (Table XVI).

MINERAL NUTRITION IN INFLUENCING PHOTOSYNTHESIS

The genetic potentiality of mulberry can be fully exploited within the constraint posed by site and climate only by maintaining a continuous and adequate supply of water and of the minerals necessary for the biomass production. The rate of nutrient supply must match with the assimilation rate, so that, the supply rate increases with the increase in the rate of assimilation by the plants. The importance of mineral nutrition on plant growth, physiological and biochemical processes of mulberry is well documented by Chakraborti (1996c). The importance of nutrients in mulberry is detailed by Singhal and Mala (1998). Singhal *et al.*, (1999c) have indicated a sharp fall in the photosynthetic rate and other gas exchange parameters in mulberry under the absence of mineral nutrients (Table XVII). Under P, K, Mg and Fe deficiency, gas exchange parameters were severely affected. Mesophyll tissue efficiency was drastically reduced under nutrient deficiency. Singhal *et al.* (1999a, b) have also investigated the change in photosynthetic rate under different doses of N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, and Zn while finding out the critical levels of their requirement for high gas exchange parameters and leaf yield. The critical levels of N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn and Zn requirement were 350 kg/ha/yr., 100 kg/ha/yr., 100 kg/ha/yr., 0.25%, 0.15%, 0.28%, 0.45%, 0.55%, 0.11%, 0.16% and 0.24%.

respectively, for high photosynthetic rate (Tables XVIII-XIX). Leaf yield was also higher at these critical levels of nutrients (Singhal *et al.*, 1999 a, b). The effects of nutrients deficiency or excess on photosynthesis in various crops are reported by Marcschner (1995) and Bergmann, (1992). Kumar and Sharma (1995) observed a depression in photosynthesis in mulberry leaves under phosphorus deficiency.

Table XV. Gas exchange parameters in two most popular mulberry varieties under different cultural practices.

Tableau XV. Paramètres d'échange de gas chez deux des variétés de mûrier les plus populaires dans des conditions de culture différentes.

Package	Photosynthetic rate	Stomatal conductance	Intercellular CO ₂ conc	Transpiration	A/Sc (× 100)	I CO ₂ / Sc
<i>Ensemble</i>	<i>Taux de photosynthèse (µmoles m⁻² s⁻¹)</i>	<i>Conductivité stomatique (m moles m⁻² s⁻¹)</i>	<i>Conc. Inter cellulaire en CO₂ (ppm)</i>	<i>Transpiration (µmoles m⁻² s⁻¹)</i>		
V1S1F1	16.40	43.3	342.51	0.0031	37.87	7.91
V2S1F1	15.41	42.3	350.85	0.0031	36.43	8.29
V1S2F1	23.42	53.3	363.98	0.0039	43.94	6.83
V2S2F1	11.29	32.4	288.63	0.0029	34.84	8.91
V1S1F2	17.79	43.4	415.30	0.0032	40.99	9.57
V2S1F2	12.56	32.5	288.16	0.0031	38.65	8.87
V1S2F2	22.36	52.2	289.05	0.0038	42.83	5.54
V2S2F2	10.97	32.0	415.17	0.0029	34.28	12.97
CD at 5%	1.23	0.1	16.98	0.0001		

V1 = V-1 mulberry variety / variété de mûrier V-1.

V2 = S-36 mulberry variety / variété de mûrier S-36.

S1 = 60 × 60 cm spacing / espacement de 60 × 60 cm.

S2 = (90+ 180) × 60 cm spacing / espacement de (90+ 180) × 60 cm.

F1 = 300:120:120 NPK kg/ha/yr / 300:120:120 NPK kg/ha/année.

F2 = 150:30:120 NPK kg/ha/yr + 20kg bacterial biofertilizer/ha/yr
+ VA Mycorrhiza
+ n- triacontanol
(250 ml/ha/crop in two split doses).
F2 = 150:30:120 NPK kg/ha/année + 20 kg d'engrais biologique bactérien /ha/année.
+ Micorhizes VA
+ n- triacontanol
(250 ml/ha/ récolte en deux doses séparées).

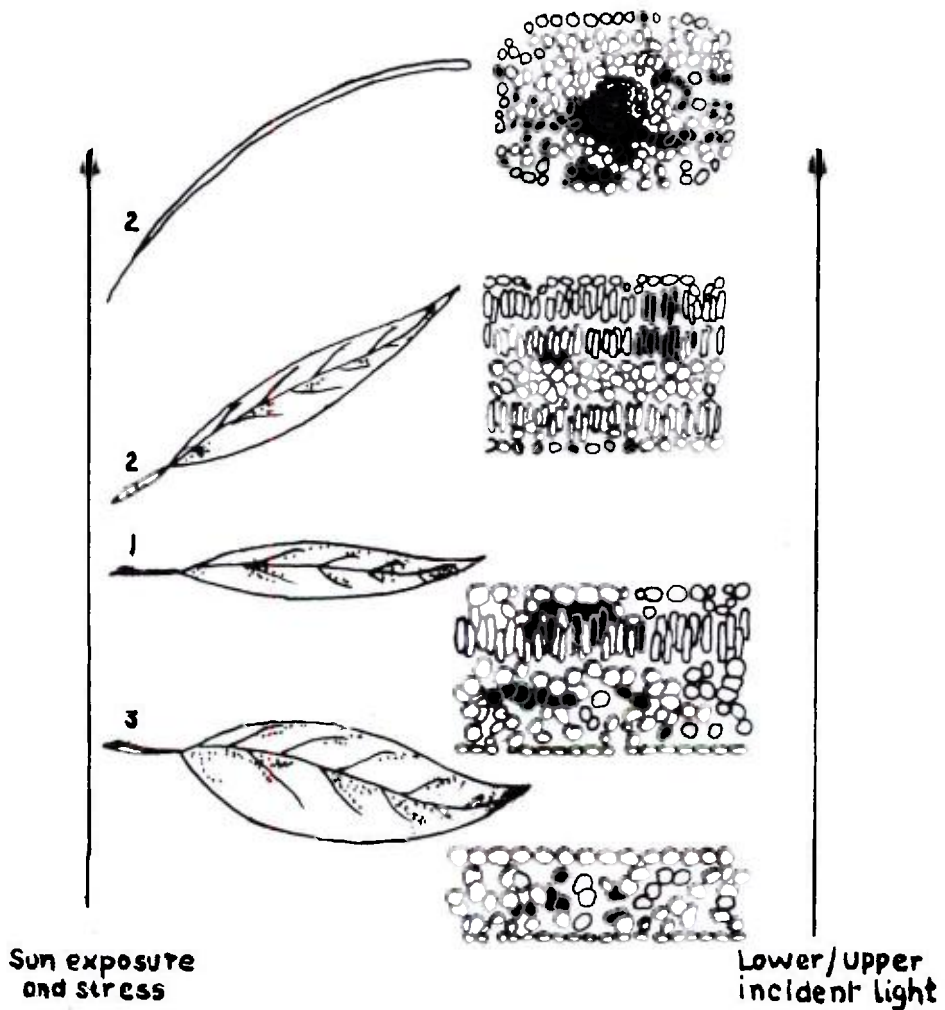


Figure 1. The interaction between leaf structure and orientation, and the amount of sunlight incident on the top and bottom of the leaf according to the environmental conditions listed in Table XIV. Numbers correspond to the rankings that are given for photosynthetic potential in Table XIV, and the cross-sections show the corresponding structural and orientational features of each type of leaf.

Figure 1. Interaction entre la structure de la feuille et l'orientation, et la quantité de soleil tombant sur le haut et le bas de la feuille en fonction des facteurs environnementaux présentés dans le Tableau XIV. Les nombres correspondent aux classements qui sont donnés au potentiel photosynthétique dans le Tableau XIV, et les coupes montrent les caractéristiques de structure et d'orientation correspondant à chaque type de feuilles.

CHEMICAL INTERACTIONS OF WEEDS IN INFLUENCING PHOTOSYNTHESIS

The study of chemical interactions and the allelochemicals has given birth to a new field of chemical eco-physiology called 'Allelopathy'. Recently Waller (1998) defined allelopathy as any process involving secondary metabolites produced by plants, algae, bacteria, fungi and viruses that influence the growth and development of agricultural and biological systems; a study of the functions of secondary metabolites, their significance in biological organisation, their evolutionary origin and elucidation of the mechanisms involving plant-plant, plant-micro-organisms, plant-virus, plant-insect and plant-soil-plant interactions. A class of chemicals through which organism of one species affect the growth, health and behaviour of population biology of another species are called allelochemicals. The present trend in agriculture productivity is to reduce the use of chemical fertilisers and switch over to natural allelochemicals.

Table XVI. Effect of plant growth regulators on leaf yield and photosynthetic rate of mulberry variety S-1.

Tableau XVI. Effet de régulateurs de croissance sur le rendement en feuilles et sur le taux photosynthétique de la variété de mûrier S-1.

Treatment	Photosynthesis ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Leaf yield (kg/ha/season)
<i>Traitement</i>	<i>Photosynthèse</i> ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	<i>Rendement en feuilles</i> (kg/ha/saison)
Control / Témoin	8.6	6491
Planofix (NAA based / basée sur NAA)	11.8	8733
Biozyme crop + (Kinetin + GA ₃ + Auxin precursors) <i>Culture biozyme + (Kinetin + GA₃ + précurseurs d'auxine)</i>	10.5	8365
Miraculan (Triaccontanol)	10.0	7829
Vipul (Triaccontanol)	9.6	7052

Das and Setua (1994)

Table XVII. Changes in gas exchange parameters of mulberry (K-2) leaf under nutrient deficiency.

Tableau XVII. Changements des paramètres d'échange de gaz de la feuille de mûrier (K-2) en manque de nutriments.

Treatment	Photosynthetic rate	Stomatal conductance	Intercellular CO ₂ concentration	Transpiration rate	A/Sc (× 100)	ICO ₂ /Sc
<i>Traitement</i>	<i>Taux photosynthétique</i>	<i>Conductivité stomatique</i>	<i>Concentration intercellulaire en CO₂</i>	<i>Taux de transpiration</i>		
	($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{m moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(ppm)	($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
Complete	8.857	33.4	303.400	0.008	26.52	9.08
-N	1.534	5.9	344.367	0.002	26.00	58.37
-P	0.231	1.3	315.733	0.001	17.77	242.87
-K	0.396	1.2	268.800	0.001	33.00	224.00
-Ca	1.484	8.0	337.487	0.003	18.55	42.18
-Mg	0.648	8.6	277.100	0.002	7.53	32.22
-S	1.409	4.1	359.133	0.001	34.36	87.59
-B	4.567	10.8	278.167	0.002	42.29	25.76
-Cu	2.504	7.3	283.800	0.002	34.30	38.88
-Fe	0.577	1.6	282.267	0.001	36.06	176.42
-Mn	2.949	4.6	314.733	0.001	64.11	68.42
-Zn	1.080	2.0	341.300	0.001	54.00	170.65
CD at 5%	0.523	5.5	41.27	0.002		

Singhal *et al.*, (1999 c)

Table XVIII. Change in photosynthetic rate 'A' ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under different levels of essential elements (N, P & K) and secondary elements (Ca, Mg & S) in mulberry.

Tableau XVIII. Changement du taux de photosynthèse 'A' ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à différents niveaux en éléments essentiels (N, P & K) et en éléments secondaires (Ca, Mg & S) chez le mûrier.

Nitrogen dose (kg/ha/yr)	Phosphorus dose (kg/ha/yr)		Potassium dose (kg/ha/yr)		Calcium dose		Magnesium dose		Sulphur dose		
<i>Dose d'azote (kg/ha/année)</i>	<i>Dose de phosphore (kg/ha/an)</i>		<i>Dose de potassium (kg/ha/an)</i>		<i>Dose de calcium (%)</i>		<i>Dose de magnesium (%)</i>		<i>Dose de soufre (%)</i>		
	A		A		A		A		A		
50	2.36	20	5.153	20	5.053	0.05	6.36	0.05	8.73	0.02	7.35
100	4.30	40	7.123	40	6.430	0.10	7.41	0.10	11.31	0.04	7.47
150	7.60	60	8.843	60	8.416	0.15	8.43	0.15	13.19	0.08	8.44
200	10.31	80	11.373	80	10.780	0.20	8.58	0.20	13.61	0.16	9.54
250	12.39	100	13.553	100	13.423	0.25	9.22	0.25	12.97	0.20	9.65
300	14.03	120	13.503	120	13.463	0.30	9.48	0.30	12.97	0.24	11.15
350	15.24	140	13.536	140	13.233	0.35	9.21	0.35	12.94	0.28	11.52
400	14.06	160	13.503	160	12.713	0.40	9.18	0.40	12.94	0.32	11.54
450	13.28	180	9.660	180	11.246	0.45	9.15	0.45	12.70	0.36	11.40
500	13.13	200	8.363	200	8.506	0.50	8.88	0.50	4.85	0.40	11.11
CD at 5%	0.56		1.097		0.770		0.47		0.99		0.27

Singhal *et al.*, (1999a, b)

Table XIX. Change in photosynthetic rate 'A' ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{S}^{-1}$) under different levels of micro nutrients in mulberry.

Tableau XIX. Changement du taux photosynthétique 'A' ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{S}^{-1}$) chez le mûrier à différents niveaux de micro-nutriments.

Boron dose	'A'	Copper dose	'A'	Iron dose	'A'	Manganese dose	'A'	Zinc dose	'A'
Dose de bore (%)		Dose de cuivre (%)		Dose de fer (%)		Dose de manganèse (%)		Dose de zinc (%)	
0.25	3.27	0.35	4.45	0.05	3.51	0.10	8.19	0.04	5.39
0.30	5.42	0.39	6.24	0.06	5.61	0.12	9.01	0.08	7.64
0.35	8.31	0.43	10.10	0.07	9.57	0.14	10.23	0.12	7.99
0.40	13.00	0.47	10.12	0.08	9.21	0.16	12.02	0.16	8.52
0.45	13.18	0.51	10.24	0.09	9.99	0.18	12.07	0.20	11.00
0.50	13.15	0.55	13.11	0.10	10.09	0.20	12.11	0.24	12.12
0.55	13.13	0.59	13.12	0.11	12.02	0.22	8.19	0.28	12.12
0.60	13.05	0.63	13.10	0.12	12.04	0.24	7.17	0.32	12.11
0.65	12.03	0.67	10.34	0.13	11.34	0.26	7.00	0.36	12.10
0.70	10.03	0.71	9.45	0.14	11.24	0.28	6.99	0.40	12.09
CD at 5%	0.14		0.16		1.88		0.14		0.23

Table XX. The change in photosynthetic rate and leaf yield under allelopathy of nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) in mulberry

Tableau XX. Changement du taux de photosynthèse et du rendement en feuilles chez le mûrier sous l'alleléopathie de *Cyperus rotundus* L.

Nutsedge plant part	Concentration	Photosynthetic rate	Leaf yield per plant
Partie de <i>Cyperus rotundus</i>	(%)	Taux de photosynthèse ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Rendement en feuilles par plant (g)
Control / Témoin	-	23.117	438.84
Leaf / Feuille	5	15.235	383.61
	10	14.252	323.43
	15	9.142	204.01
	20	No sprouting of mulberry cuttings Pas de débourrage des boutures de mûrier	
Tuber / Tubercule	5	28.402	583.26
	10	26.205	510.34
	15	22.572	446.73
	20	19.220	433.89
CD at 5%		2.614	15.49

Singhal *et al.* (1998). Density of plantation = 60×60 cm between plant to plant and row to row / Densité de plantation = 60×60 cm entre chaque plant et chaque rangée.

Singhal *et al.*, (1998) reported an increase of 22.90% of the photosynthetic rate over control in mulberry leaf treated with 5% tuber extracts of nuts edge, *Cyperus rotundus* (Table XX) Similarly, an increase in 32.91% leaf yield per plant over control was obtained. It was suggested to use 5% tuber extracts of *C. rotundus* in enhancing photosynthetic rate and subsequently leaf yield and quality of mulberry. No information is available on any other plant having similar effects on mulberry.

CONCLUSION

The work carried out on different aspects reveals that mulberry crop productivity can be increased through improved photosynthesis as there is a close relationship between the photosynthetic rate and the leaf yield. A lot of studies need to be carried out with regard to the variation in photosynthesis of mulberry under different stress conditions. Genotypes available in the germplasm bank need thorough screening for photosynthetic rate in relation to leaf yield and other important parameters like leaf inclination, structure and related characters. As has been found, C₄ syndrome needs a thorough study among promising genotypes for effective utilisation of potential parents in breeding programmes. Based on the information generated, more meaningful breeding programmes could be chalked out for evolving high yielding varieties with a higher photosynthetic rate. A suitable variety based on package needs to be planned for imposing assimilatory characters under different eco-climatic zones. Photosynthetically efficient genotypes suited to water stress conditions need to be evolved. Among the genotypes studied, S-13 is suggested as the physiologically most efficient genotype for use in various crop improvement programmes as revealed by high photosynthetic rate, low L/D ratio, higher incorporation of ¹⁴CO₂ and leaf yield. Meanwhile, as reported for the possibility of C₄ syndrome in Tr-10, it can be grown in different zones for its better utilisation of solar energy. As positive correlations have been found between the leaf photosynthesis and yield potential of some of the mulberry genotypes, it needs further investigations in a large number of germplasm accessions. If confirmed, it may serve as a useful index for future mulberry crop improvement programmes by selecting genotypes having a greater photosynthetic efficiency. Further investigations on this line may serve as an important tool to exploit a photosynthetic route in increasing mulberry crop productivity in time to come under various eco-climatic zones.

REFERENCES

- AQUEEL S.A., ITO D., NAOI T. (1999) Proportional relationship between intercepted solar radiation and dry matter production in a mulberry field. Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., 21, 1-12.
- AUSTIN R.B. (1989) Genetic variation in photosynthesis. J. Agric. Sci. Camb., 112, 287-294.
- BASSHAM J.A. (1977) Increasing crop production through more controlled photosynthesis. Science, 197, 630-638.
- BERGMANN W. (1992) Nutritional disorders of plants-development, visual and analytical diagnosis. Gustav Fischer, Verlag Jena.
- BOARDMAN N.K. (1980) In: Solar energy. Eds: G. Porter, W. Hawthorne, Royal Society, London, 132-145.
- BOSE A., GHOSH B. (1995) Responses of photosynthetic apparatus in rice cultivars under heat stress. Photosynthetica, 31, 625-630.
- CHAKRABORTI S. (1993) Photosynthetic ¹⁴CO₂ incorporation in some exotic varieties of mulberry (*Morus* spp.). Geobios, 20, 200-205.
- CHAKRABORTI S., SINGHAL B.K., THIPPESWAMY T., REKHA M. (1996a) Studies on the relationship between gas exchange traits and genetic variability in mulberry (*Morus alba* L.) under irrigated and rainfed conditions. Indian J. Seric., 35, 54-56.
- CHAKRABORTI S., SINGHAL B.K., SINGHVI N.R. (1996b) An evaluation of morpho-physio and biochemical parameters correlated with leaf yield in mulberry (*Morus* spp.) under rainfed condition. Proc. Symposium on Plant. Physiol. for Nat. Devt., Bose Institute, Calcutta, p. 41.

- CHAKRABORTI S., SUBRAMANYAM M.R., SINGHAL B.K., DATTA R.K. (1996c) Nutrient deficiency management in mulberry - a key for identification of hunger signs, CSRTI, Mysore, India.
- CHAKRABORTI S., SINGHAL B.K., SINGHVI N.R. (1997) Correlation of morpho physiological and biochemical parameters with leaf yield. Final Report, CSRTI, Mysore, India.
- CHAVES M.M. (1991) Effect of water deficit on carbon assimilation. *J. Expt. Bot.*, 42, 1-16.
- DAS C., CHATTOPADHYAY S., GHOSH J. K. (1994) Phasewise physiobiochemical screening of exotic mulberry varieties of germplasm bank with special reference to photosynthetic efficiency. CSRTI, Berhampore Annual Report, p. 26.
- DAS C., DAS B.K., SEN S.K., PAVAN KUMAR T. (1997) Studies on the photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation: Occurrence of the C_4 photosynthetic syndrome in mulberry (*Morus* spp.). *Sericologia*, 37, 89-97.
- DAS C., MISRA A.K. (1996) Physio-biochemical screening of drought tolerant varieties at natural drought prone area. CSRTI, Berhampore Annual Report, p. 30.
- DAS C., SENGUPTA T., GHOSH J.K. (1994) Phasewise physio-biochemical screening of indigenous mulberry varieties of germplasm bank with special reference to photosynthetic efficiency. CSRTI, Berhampore Annual Report, pp. 26-27.
- DAS C., SETUA M. (1994) Improvement of plant productivity through use of commercial growth regulators. CSRTI, Berhampore Annual Report, pp. 27-28.
- DAS C., SETUA M. (1997) Physio-biochemical screening of water logged tolerant varieties of mulberry. CSRTI, Berhampore, Annual Report, pp. 26-27.
- DAY W., LAWLOR D.W., DAY A.T. (1987) The effect of drought on barley yield and water used in two contrasting years. *Irrigation Science*, 8, 115-130.
- ERIKSEN A.B., SELLDEN G., SKOGEN D., NILSEN S. (1981) Comparative analysis of the effect of triacontanol on photosynthesis, photo respiration and growth of tomato (C_3 plant) and maize (C_4 -plant). *Planta*, 152, 44-49.
- FERIERES E. (1985) Responses to water deficits in relation to breeding for drought resistance. In: Drought tolerance in winter cereals, Eds: SRIVASTAVA J.P., PORCEDDU E., ACEVEDO E., VERMA S., John Wiley & Sons, Chichester, 263-274.
- GALSTON A.W. (1992) Photosynthesis as a basis for life support on earth and in space. *Bioscience*, 42, 490-493.
- HALL D.O., LONG S.P. (1993) Photosynthesis and the changing environment. In: Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual, Eds: Hall D.O., Scurlock J.M.O., Bolhar-Nordenkamp H.R., Leegood R.C., Long S.P., Chapman & Hall, London.
- ITO D. (1995) Ecological studies on light interception and photosynthesis of mulberry populations. *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, 13, 1-142.
- JORDAN W.R., RITCHIE J.T. (1971) Influence of soil water stress on evaporation, root absorption and internal water status of cotton. *Plant Physiol.*, 48, 783-788.
- KRAMER P.J. (1983) Water relations of plants. Academic Press, New-York, pp. 342-389.
- KRIEDMANN P.E. (1986) Stomatal and photosynthetic limitations to leaf growth. *Australian J. Plant Physiol.*, 13, 15-31.
- KRIEG D.R. (1983) Photosynthetic activity during stress. *Agric. Water Manage.*, 7, 249-263.
- KUMAR N., SHARMA P.N. (1995) Effects of phosphorus deficiency stress on photosynthesis in mulberry, *Morus alba* L., *Indian J. Expt. Biol.*, 33, 616-619.
- LAWLOR D.W., UPRETY D.C. (1993) Effects of water stress on photosynthesis of crops and the biochemical mechanism. In: Photosynthesis - Photoreactions to Plant productivity, Eds: Abrol Y.P., Mohanty P., Govindjee, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., pp. 419-449.
- LEGG B.J., DAY W., LAWLOR D.W., PARKINSON K.J. (1979) The effects of drought on barley growth, models and measurements showing the relative importance of leaf area and photosynthetic rate. *J. Agric. Sci. Camb.*, 92, 703-716.

- LEIDI E.O., LOPEZ J.M., LOPEZ M., GUTIERREZ J.C. (1993) Searching for tolerance to water stress in cotton genotypes: Photosynthesis, stomatal conductance and transpiration, *Photosynthetica*, 28, 383-390.
- MARCSCHNER H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic press, London, p. 889.
- MATUS A., SLINKARD A., KESSEL C.V. (1995) *Crop Sci.*, 35, 1267-1271.
- MENON K.K.G., SRIVASTAVA H.C. (1984) Increasing plant productivity through improved photosynthesis. *Proc. Ind. Acad. Sci. (Plant Science)*, 93, 359-378.
- MISRA A.K., DAS C., SENGUPTA T., SETUA M., SAHU P.K., SINGH DEO S.N. (1996) Physio-biochemical evaluation of mulberry varieties for drought tolerance. *Proc. Symp. Plant Physiol. for Nat. Dev.*, Bose Institute, Calcutta, p. 27.
- OLIVER D.J., ZELITCH I. (1977) Increasing photosynthesis by inhibiting photorespiration with gilyoxylate. *Science*, 196, 1450-1451.
- OSMOND C.B., BJORKMAN O., ANDERSON D.J. (1980) Physiological processes in plant ecology. Springer-verlag, Berlin and New-York.
- RABINOWITCH E.I. (1945) Photosynthesis and related process. Interscience, New-York.
- RADIN J.W., HARTUNG W., KIMBALL B.A., MAUNEY J.R., (1988) Correlation of stomatal conductance with photosynthetic capacity of cotton only in a CO₂ enriched atmosphere: Mediation by abscisic acid. *Plant Physiol.* 88, 1058-1062.
- RAMANUJAM T., VENKATARAMANA S., BALASUNDRAM N. (1997) Photosynthetic performance of sugarcane genetic stocks under moisture stress conditions. *Proc National Seminar on 'Plant Physiology for Sustainable Agriculture'*, IARI, New Delhi, p. 115.
- RIES S.K., WERT V., SWEELEY C.C., LEAVITT R.A. (1977). Triacontanol: a new naturally occurring plant growth regulator. *Science*, 195, 1339-1341.
- RUSSEL E.W. (1973) Soil conditions and plant growth, 10th Edn, ELBS and Longmann, London, p. 23.
- SASAKI H., ISHII R. (1992) Cultivar differences in leaf photosynthesis of rice bred in Japan. *Photosynthesis Res.*, 32, 139-146.
- SENGUPTA U.K. (1988) Effect of increasing CO₂ concentration on photosynthesis and photorespiration in wheat leaf. *Current Science*, 57, 145-146.
- SHARMA A.P., SINGH S.P. (1994) Genotypic variation in photosynthesis and yield component in rice. *Indian J. Plant. Physiol.*, 37, 188-189.
- SHESHSHAYEE M.S., KRISHNA PRASAD B.T., NATARAJ K.N., SHANKAR A.G., PRASAD T.G., UDAYAKUMAR M. (1996) Ratio of intercellular CO₂ concentration to stomatal conductance is a reflection of mesophyll efficiency. *Current Science*, 70, 672-675.
- SINGHAL B.K., MALA V.R. (1998) An insight into silkworms food. *The Indian Text. J.*, 108, 86-88.
- SINGHAL B.K., MALA V.R., MADHAVA RAO Y.R., DATTA R.K. (1998) Chemical interactions of *Cyperus rotundus* L.) on assimilation rate and protein content of mulberry (*Morus indica* L.). *Proc. III International Congress on Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry*, UAS, Dharwad, p. 57.
- SINGHAL B.K., MALA V.R., SARKAR A., DATTA R.K., (1999a) Nutritional disorders of mulberry (*Morus* spp.) II. Leaf nutrient guide for N, P, and K. *Proc. International Symposium on Plant Protection and Plant Nutrition*. Beijing International Convention Centre, Beijing, China, April 13-16, 1999.
- SINGHAL B.K., MALA V.R., SARKAR A., DATTA R.K. (1999b) Nutritional disorders of mulberry (*Morus* spp.) II. Leaf nutrient guide for secondary nutrients. *Sericologia*, in press.
- SINGHAL B.K., MALA V.R., CHAKRABORTI S. (1999c) Nutritional disorders of mulberry (*Morus* spp.) I. Physiological and biochemical changes under deficiency. *Philippine J. Sci.*, in press.
- SINGHAL B.K., ROOPA (1998) Changes in physiological and biochemical parameters of promising mulberry (*Morus indica* L.) varieties under water stress condition. *Philippine J. Sci.*, 127, 277-286.
- SINGHAL B.K., VINEET KUMAR, MALA V.R. (1999d) SEM studies on the leaf surface of promising mulberry (*Morus* spp.) genotypes. *J. Pl. Biol.*, 42, 71-74.

- SMITH WILLIAM K., VOGELMANN THOMAS C., DELUCIA EVAN H., BELL DAVID T., SHEPHERD KELLY A. (1997) leaf form and photosynthesis. *Bioscience*, 47, 785-793.
- SOUTHWOOD R. (1986) Plant surfaces and insects - An overview, pp. 1-22; In: *Insects and the plant surface*. Eds: B.E. Juniper, T.R.E. Southwood, Edward Arnold Publishers Ltd., London.
- SRINIVASA RAO N.K., BHATT R.M. (1990) Response of photosynthesis to water stress in two egg plants (*Solanum melongena* L.) cultivars. *Photosynthetica*, 24, 506-513.
- SWINDALE L.D., BIDINGER F.R. (1981) Introduction: the human consequences of drought and crop research priorities for their alleviation. In: (L.G. Paleg and D. Aspinall, eds), *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney.
- UDAYAKUMAR M., SHESHSHAYEE M.S., NATARAJ K.N., BINDU MADHAVA H., DEVENDRA R., AFTAB HUSSAIN I.S., PRASAD T.G. (1998) Why has breeding for water use efficiency not been successful? An analysis and alternate approach to exploit this trait for crop improvement. *Current Science*, 74, 991-1000.
- VU J.C., ALLEN L.H., BOWES G. (1987) Drought stress and elevated CO₂ effects on soybean ribulose biphosphate carboxylase activity and canopy photosynthetic rates. *Plant Physiol.*, 83, 573-578.
- WADA M., CARVALHO LUIZ J.C.B., RODRIGUES G.C., ISHII R., (1994) Cultivar differences in leaf photosynthesis and grain yield of wheat under soil water deficit conditions. *Jpn. J. Crop Sci.*, 63, 339-344.
- WALLER G.R. (1998) Allelopathy - Is this the definition we want? *International Allelopathy Society Newsletter*, 2,5.
- ZELITCH T. (1982) The close relationship between net photosynthesis and crop yield. *Bioscience*, 32, 796-802.
- ZELITCH T. (1992) Control of plant productivity by regulation of photorespiration. *Bioscience*, 42, 510-515.

REVUE SUR LE ROLE DE LA PHOTOSYNTHESE DANS L'AMELIORATION DE LA RECOLTE CHEZ LE MURIER (*MORUS* SPP.)

B.K. SINGHAL*, S. CHAKRABORTI, MALA V. RAJAN, A. SARKAR & R.K. DATTA

Laboratory of Mulberry Physiology, Central Sericultural Research & Training Institute,
Mysore 570 008, Inde

INTRODUCTION

La photosynthèse est la base de la vie car elle dirige les grands cycles d'absorption du CO₂ et d'évolution de l'O₂. Chaque année, environ 200 milliard de tonnes de carbone sont retirées de l'atmosphère sous forme de gaz carbonique et incorporées dans les composés organiques des plantes par le processus de la photosynthèse (Rabinowitch, 1945). La photosynthèse est la base énergétique pour toutes activités de la vie humaine et animale sur la terre parce que les molécules organiques produites photosynthétiquement, quand elles sont oxydées dans la respiration libèrent l'énergie des photons bloquée pendant la réduction originelle du gaz carbonique. La photosynthèse est donc le lien principal entre l'énergie solaire et la vie (Galston, 1992).

Les plantes n'ingèrent qu'environ 2,6 % d'azote et 0,31 % de phosphore venant du sol alors que 90 % du poids sec vient de la photosynthèse par l'utilisation du CO₂ atmosphérique, de l'eau et du soleil (Russel, 1973). La photosynthèse est absolument essentielle même pour l'incorporation de l'azote et du phosphore. Alors que l'augmentation de la productivité des récoltes en optimisant les nutriments semble avoir atteint un plateau, il existe de grandes possibilités pour augmenter les rendements en jouant sur la photosynthèse. On a calculé que la limite supérieure pour une efficacité photosynthétique maximum chez les plantes terrestres est de l'ordre de 6,6 % (Bassham, 1977), mais la plupart des cultures ont une efficacité photosynthétique qui n'est que de 0,15 à 0,2 % (Boardman, 1980), ce qui laisse suggérer que l'on pourrait bien augmenter le taux et donc les rendements.

Hall et Long (1993) ont indiqué que l'efficacité de la conversion d'énergie est déterminée directement par le processus photosynthétique, elle exprime la relation directe entre la productivité et la photosynthèse. L'amélioration de l'efficacité de la conversion d'énergie est le moyen le plus intéressant pour augmenter la productivité et le rendement économique. Si cela pouvait se faire, on obtiendrait une augmentation de la productivité sans augmenter les doses d'engrais.

La sériciculture est une industrie agricole et le mûrier est l'unique nourriture des vers à soie (*Bombyx mori* L.). Le rendement n'est pas sous un contrôle génétique direct mais dépend d'une multitude de processus physiologiques et biochimiques qui interagissent. Les variations génétiques, le climat, les pratiques culturales et leurs interactions influencent les processus physiologiques, contrôlent la croissance et agissent en fin de compte sur la productivité. Des facteurs défavorables, comme la sécheresse, la température, les pratiques de culture, la fertilité du sol, les attaques des insectes, etc... font baisser le rendement en affectant les processus physiologiques de la plante. Les

* Adresse actuelle de correspondance : Regional Sericultural Station, Central Silk Board, Miran Sahib, Jammu Tawi - 181 101, Jammu & Kashmir State, Inde.

variétés à haut rendement dotées d'un ensemble de processus physiologiques efficaces capables de produire des quantités plus élevées sont élaborées grâce à différentes méthodes de lignage. Chez le mûrier, bien que de nombreuses études aient été faites sur les lignages, sur l'utilisation de différentes méthodes et sur la lutte contre les maladies du mûrier pour la productivité des récoltes, peu d'attention a été accordée à l'exploitation de la photosynthèse pour améliorer la productivité des récoltes. Le travail que nous avons entrepris et que d'autres ont entrepris sur la photosynthèse en vue d'améliorer le mûrier est donc passé en revue et la nécessité d'entreprendre des études supplémentaires est discutée.

CARACTERES RELATIFS A L'ECHANGE GAZEUX ET VARIABILITE GENETIQUE PARMIS LES GENOTYPES DANS DES CONDITIONS D'IRRIGATION

On a rapporté qu'il existe une variation génétique à l'intérieur d'une espèce en ce qui concerne les caractères des échanges de gaz chez plusieurs cultures (Krieg, 1983 ; Austin, 1989 ; Sasaki et Tshii, 1992 ; Leidi et coll., 1993 ; Sharma et Singh, 1994 ; Wada et coll., Chakraborti et coll., 1996a). Chez le mûrier, la photosynthèse et d'autres échanges gazeux varient considérablement. Parmi dix génotypes de mûrier prometteurs que nous avons étudiés dans une zone tropicale (Tableau I), le taux photosynthétique le plus élevé ($20,88 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) est enregistré chez S-13, tandis que S-36 a le taux photosynthétique le plus bas ($13,72 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De même, d'autres traits comme la conductivité stomatique, la concentration intracellulaire en CO_2 et le taux de transpiration varient de manière significative entre les génotypes. Comme pour la photosynthèse, le génotype S-13 donne aussi le rendement en feuilles le plus élevé ($417,81 \text{ g / plante}$). Chez le génotype S-36, bien que le taux de photosynthèse soit le plus bas, le rendement en feuilles est plus élevé que celui des génotypes S-1, S-799 et du génotype local.

Le ratio photosynthèse « A » / conductivité stomatique « Sc » souvent considéré comme une mesure de l'efficacité d'utilisation d'eau au niveau de la feuille (Osmond et coll., 1980) varie aussi parmi les dix génotypes. L'efficacité d'utilisation de l'eau est inférieure chez les génotypes S-1 et S-34, tandis qu'elle s'avère plus élevée chez TR-10. A/Sc est compris entre 19,16 et 29,49 %. La variation génotypique pour « A » par unité « Sc » a été proposée comme un outil d'analyse de l'efficacité des échanges de gaz chez le coton (Krieg, 1983 ; Radin et coll., 1988). Udaykumar et coll., (1998) ont observé que bien que l'on soit conscient de l'importance de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) pour l'amélioration des récoltes, la variabilité génétique existant pour ce trait n'a pas été exploitée avec succès par le breeding. La sélection d'une WUE élevée entraîne souvent une baisse du taux de croissance de la culture (CGR) et ils ont observé que c'était l'inconvénient principal par rapport à l'amélioration ultérieure apportée par ce caractère. De telles tentatives n'ont pas réussi car l'amélioration de WUE est souvent associée à une baisse de l'accumulation des matières sèches et du rendement (Matus et coll., 1995). Ce manque de succès vient principalement de la forte interdépendance entre la transpiration « Tr » et « WUE ». Puisque « WUE » et « Tr » influencent directement les taux de croissance, l'interdépendance entre ces traits n'est pas désirable. Il est donc essentiel d'identifier des types où cette interdépendance est plus faible. Sheshashayee et coll., (1996) ont trouvé une relation négative entre le ratio « concentration intercellulaire en CO_2 / conductivité stomatique » et la photosynthèse chez le tournesol et le soja et proposé le ratio ICO_2/Sc comme nouvelle approche pour estimer l'efficacité du mésophylle. Parmi les dix génotypes de mûrier étudiés par les auteurs, S-13 révèle une relation de ce type et possède une efficacité plus élevée du mésophylle comparé aux autres génotypes, comme l'indique le taux photosynthétique et le rendement en feuilles plus élevés et le ratio ICO_2/SC plus faible. Cependant, le génotype Tr10 a les ratios A/Sc et ICO_2/Sc et le rendement en feuilles les plus élevés. C'est un génotype triploïde censé avoir le syndrome photosynthétique C4. Il faudrait étudier de plus près ce génotype afin de tirer des conclusions concrètes.

Das et coll., (1994), alors qu'ils passaient en revue 70 exemplaires de mûrier ont trouvé que chez les variétés japonaises, Kairyo-roso a le taux photosynthétique le plus élevé ($17,43 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tandis que la variété Seizuro a l'efficacité photosynthétique la plus faible. Parmi les exemplaires chinois, le taux photosynthétique le plus élevé ($15,71 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) est enregistré pour la variété China Back. L'évaluation de 32 variétés indiennes révèle un taux photosynthétique élevé chez Serpentina, Panjab local, Molai et Nayedgami. Il s'avère que les variétés Mirgund-6, OPH-1 et MS-9 ont un taux de photosynthèse qui est faible (Tableau II). Das et Setua (1997) ont observé que le rendement supérieur des cultivars chez le mûrier est dû à l'efficacité d'utilisation de $^{14}\text{CO}_2$ pendant la photosynthèse. Leur étude établit une forte corrélation positive entre la photosynthèse de la feuille et le potentiel de rendement de la culture.

Chakraborti et coll., (1997) ont trouvé une corrélation significative entre le rendement en feuilles de mûrier et onze caractères présentés dans les Tableaux III et IV. Les paramètres les plus importants directement corrélés avec le rendement en feuilles sont la longueur de la pousse la plus longue, la surface de la feuille et le rendement en tiges. Cependant, comme ces paramètres morphologiques sont influencés par des paramètres physiologiques comme la photosynthèse, l'efficacité d'utilisation de l'eau et les caroténoïdes, ils ont conclu que la photosynthèse, l'efficacité d'utilisation de l'eau et les caroténoïdes tout comme les paramètres morphologiques importants doivent être pris en compte pour identifier des génotypes efficaces.

ECHANGE DES GAZ ET VARIABILITE GENETIQUE CHEZ DES GENOTYPES DE MURIER PROMETTEURS NON IRRIGUES

Le manque d'eau est la contrainte principale pour la croissance et la productivité de la plante sur presque tout l'ensemble de la terre (Kramer, 1983). En Inde, la terre est soumise à des précipitations faibles, irrégulières et à une évaporation extrême presque partout. Les mauvaises récoltes qui arrivent en moyenne tous les quatre ans dans les zones semi-arides sont difficiles à prévoir (Swindale et Bidinger, 1981). Même dans les régions les plus humides, la sécheresse diminue souvent considérablement les rendements (Lawlor et Uperety, 1993). Le potentiel réel du mûrier ne peut pas être exploité à cause des limitations des processus physiologique et biochimique imposées par le stress hydrique. Le taux photosynthétique et d'autres paramètres d'échange de gaz baissent forcément lorsqu'il y a un stress environnemental et chez le mûrier, l'organe photosynthétique, la feuille est elle-même le rendement économique. Chakraborti et coll., (1996 b) ont observé une corrélation positive significative entre le nombre de feuilles par plante et le taux de photosynthèse et le rendement dans le cas d'arrosage par les pluies. Les deux causes principales de la baisse de production en cas de stress hydrique sont la diminution de la surface de la feuille et les taux plus faibles de photosynthèse par surface de feuille unitaire (Jordain et Ritchie, 1971 ; Legg et coll., 1979 ; Zelitch, 1982 ; Fereres, 1985 ; Kriedmann, 1986 ; Day et coll., 1987 ; Leidi et coll., 1993 ; Ramanujam et coll., 1997 ; Singhal et Roopa, 1998). La baisse du taux photosynthétique en cas de stress hydrique a été rapportée chez plusieurs cultures (Srinivasa Rao et Bhatt, 1990 ; Chaves, 1991 ; Bose et Ghosh, 1995). Les paramètres d'échange de gaz chez 10 génotypes de mûrier prometteurs cultivés dans une zone tropicale de l'Inde, la principale zone de production de soie du pays, révèlent une sévère baisse du taux photosynthétique en cas d'arrosage par les pluies (Tableau V) par comparaison à l'irrigation volontaire (Tableau I). Le génotype S-13 qui a le taux photosynthétique le plus élevé ($20,88 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en cas d'irrigation présente presque le taux photosynthétique le plus bas ($8,84 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) avec l'alimentation par les pluies. Le génotype RFS-135 a presque le même taux photosynthétique dans des conditions d'arrosage par les pluies et d'irrigation. Cependant, le taux photosynthétique ne varie pas de manière significative entre les génotypes arrosés par les pluies. On note aussi une relation négative entre « A » et le ratio ICO_2/Sc .

Dans une expérience de culture en pots, trois variétés populaires, K-2, S-13 et V-1 présentent une chute brutale du taux de photosynthèse en condition de stress hydrique (Tableau VI). La baisse

maximum du taux photosynthétique (70,4 %) est enregistrée pour la variété K-2, cultivée avec un stress hydrique pendant 15 jours. Un stress hydrique pendant plus de 15 jours entraîne la mort des plants de mûrier (Singhal et Roopa, 1998). Das et Misra (1996) ont analysé sept variétés importantes de l'est de l'Inde tolérant la sécheresse et enregistré un taux photosynthétique ($17,35 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), un rendement en feuilles (3983, 48 kg/ha) et une efficacité d'utilisation de l'eau élevés chez la variété S-1730 par comparaison aux variétés S-1, SV-1, S-1531, S-13, S-34 et S-1635 (Tableau VII). Misra et coll., (1996) ont évalué quinze variétés de mûrier, soit S-1, C-1730, C-763, C-776, C-1733, C-1726, C-1729, C-1614, C-1690, S-799, S-1708, S-1608, S-1635, TR-4 et TR-10 dans le but de sélectionner une souche adaptée tolérant la sécheresse. Ils ont trouvé que la variété C-1730 présente un taux photosynthétique, une efficacité d'utilisation d'eau et un rendement en feuilles les plus élevés dans une zone naturellement sujette à la sécheresse de la région de Purulia, dans le Bengale ouest (Inde de l'est). C-1729 s'avère être la variété la plus sensible. Lawlor et Uprety (1993) ont résumé les causes de la baisse de la photosynthèse des feuilles soumises à un stress hydrique. Les effets du stress sont expliqués par un mécanisme basé sur : une baisse de la conductivité stomatique, une hausse de la concentration ionique (en particulier Mg^{2+}) des chloroplastes, une inhibition progressive de la synthèse d'ATP par l'enzyme $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ due à la hausse de la concentration en magnésium, le maintien de taux relativement élevés de transport des électrons et une baisse des nucléotides pyrimidiques et peu de changements des composants enzymatiques de la photosynthèse et de leurs caractéristiques. Si les effets sur le métabolisme sont importants, le système photosynthétique se détériore de manière irréparable. L'effet sur l'activité de la ribulose diphosphate carboxylase et sur les taux photosynthétiques du soja dû à la sécheresse et à l'élévation du CO_2 a aussi été observé par Vu et coll., (1987).

LA PHOTOSYNTHESE DANS DES CONDITIONS D'EXCES EN EAU

Le trop plein en eau baisse la température du sol et inhibe la respiration des racines à cause d'un manque en O_2 . Il entraîne une baisse du potentiel d'oxydo-réduction du sol et des composés nocifs s'accumulent. Les racines sont empoisonnées à cause des composés toxiques. Les activités des bactéries aérobiques sont inhibées, ce qui influence la décomposition des matières organiques dans le sol. Das et Setua (1997) ont évalué sept variétés de mûrier, Jatinuni, Kanva-2, Koliakotai, S-1635, S-1, Maida-local et Kolitha-3 pour leur tolérance à un sol détrempé (à un niveau de 30 cm pendant une durée de 10 jours). Le taux de photosynthèse et le rendement en feuilles baissent de manière considérable chez toutes les variétés (Tableau VIII). Les variétés S-1635, S-1 et Malda local s'avèrent les plus touchées dans des conditions de sol détrempé. Kolitha-3 est la variété la moins touchée. On note un retard des effets dus à un trop plein d'eau en utilisant des régulateurs de croissance à base de kinétine.

INCORPORATION PHOTOSYNTHETIQUE DE $^{14}\text{CO}_2$ CHEZ DES VARIETES EXOTIQUES ET INDIENNES

Chakraborti (1993) a étudié certaines variétés de mûrier exotiques, en l'occurrence Moretti Seringe, Morettiana, Ichinose, China white et Goshyoerami par rapport à leur incorporation photosynthétique totale de ^{14}C . On observe une variation considérable des taux de fixation de $^{14}\text{CO}_2$ quelle que soit la base (chlorophylle, surface foliaire ou poids frais). On observe que l'incorporation de ^{14}C chez Morettiana et Ichinose est un peu plus élevée que chez les autres variétés (Tableau IX). La distribution du ^{14}C fixé photosynthétiquement dans les fractions solubles à l'alcool et insolubles à l'alcool révèle que les variétés Ichinose et Morettiana ont une incorporation de $^{14}\text{CO}_2$ plus élevée à la fois dans les fractions solubles et insolubles à l'alcool comparées aux quatre autres variétés (Tableau X). Les photosynthétats sont plus ou moins les mêmes chez toutes les variétés. Selon

Chakraborti (1993) une quantité significative de malate et d'aspartate révèle une voie métabolique intermédiaire entre C₃ et C₄ chez le murier.

Das et coll., (1997) ont étudié la capacité de fixation photosynthétique de ¹⁴CO₂ chez quinze variétés de mûriers exotiques et établies en Inde, c'est à dire Kajli, Bombay local, S-1, S-799, C-763, S-54, Tr-10, S-1635, C-1730, BC2-59, China white, Kosen, Kanva-2, Goshyoerami et Ichinose en utilisant du NaH¹⁴CO₃ radioactif. La photosynthèse apparente que l'on trouve est significativement plus élevée chez les cultivars triploïdes TR-10, S-1635 et C-1730 que chez S-799, C-763, S-54 et Kanva-2 qui sont considérés comme des cultivars à haut rendement. Ils ont aussi trouvé une corrélation positive entre le taux de fixation de ¹⁴CO₂ photosynthétique et la teneur en chlorophylle sauf chez S-1. Parmi les variétés exotiques, Goshyoerami est celle qui a la photosynthèse la plus élevée. Ils ont rapporté avoir enregistré une plus grande quantité d'incorporation de ¹⁴CO₂ dans l'acide malique et aspartique, les composés à quatre carbones chez les cultivars triploïdes. Le ratio des composés C₃/C₄ est inférieur à l'unité, ce qui indique la dominance des composés d'acide dicarboxylique C₄ (Tableau XI). La phosphoenolpyruvate carboxylase est plus active chez les variétés triploïdes que la 1,5-biphosphate ribulose carboxylase, ce qui suggère fortement qu'un syndrome photosynthétique C₄ plus efficace se produit chez les génotypes de murier. Ils ont suggéré qu'il peut être utilisé de manière profitable pour évaluer les cultivars efficaces dans des programmes de breeding futurs. Chez 10 génotypes de murier, en l'occurrence S-34, S-13, S-54, RFS-135, S-1, TR10, S-799, S-36, K-2 et local étudiés par l'auteur principal, la distribution du ¹⁴C fixé photosynthétiquement dans les fractions solubles à l'alcool et insolubles à l'alcool révèle une incorporation plus élevée de ¹⁴CO₂ à la fois dans les fraction solubles et insolubles à l'alcool chez les génotypes S-13 et S-799 par comparaison aux autres génotypes (Tableau XII). Le fractionnement chromatographique de la fraction soluble à l'alcool révèle des différences significatives du mode de marquage de ¹⁴C entre les génotypes. Parmi les sucres, le saccharose est le composé le plus abondamment marqué et plus encore chez le génotype S-13. Les acides malique et succinique sont aussi marqués et sont plus abondants chez S-13. L'incorporation dans l'alanine, la tyrosine et la sérine est plus élevée chez tous les génotypes. Mais les niveaux d'acides aspartique et glutamique sont plus élevés chez S-13 et S-1.

PHOTO RESPIRATION ET RESPIRATION DANS L'OBSCURITE CHEZ LE MURIER

Les composés en C₃ perdent jusqu'à 40 % de CO₂ net assimilé dans des conditions atmosphériques normales à cause de la photorespiration. L'amplitude relative dépend des espèces, de la température, de l'intensité de la lumière et d'autres facteurs.

Les taux de photorespiration (L) et à l'obscurité (D) ont été étudiés chez dix génotypes de murier: S-34, S-13, S-54, RFS-135, S-1, TR-10, S-799, S-36, K-2 et Mysore local, en utilisant du NaH¹⁴CO₃ marqué radioactivement. Le taux de photorespiration et le ratio L/D les plus bas sont observés chez le génotype S-13, suivi par S-799 (Tableau XIII). Ainsi le génotype S-13, a un taux photosynthétique élevé avec moins de photorespiration. Comme nous l'avons indiqué précédemment, ce génotype présente aussi une incorporation de ¹⁴CO₂ plus élevée à la fois dans les fractions solubles à l'alcool et insolubles à l'alcool, ce qui donne le rendement le plus élevé parmi les génotypes étudiés.

Zelitch (1992) a suggéré une régulation de la photorespiration selon les voies suivantes pour contrôler la productivité de la plante.

1. Changer les caractéristiques de l'enzyme de sorte que l'affinité du RuBISCO pour le CO₂ soit plus importante avec relativement moins d'oxygénation.
2. La compartimentation chez les plantes qui régulent partiellement la photorespiration se produit chez certains composés connus comme des intermédiaires de C₃-C₄.
3. La sélection de la photosynthèse résistante à l'oxygène.
4. Le renforcement de l'activité de la catalase chez les mutants.

5. Le clonage du gène de la catalase et la production de plantes transgéniques avec différents niveaux d'activité de catalase.

Oliver et Zelitch (1977) ont observé que le traitement au glyoxylate double la fixation photosynthétique nette de CO_2 dans des disques foliaires de tabac à cause de l'inhibition de la synthèse du glycolate par le glyoxylate qui entraîne la baisse de la photorespiration. Sengupta (1988) a remarqué une augmentation de l'incorporation photosynthétique de CO_2 dans la feuille du blé avec une augmentation de la concentration en CO_2 , ce qui entraîne une baisse de la photorespiration.

SURFACE DE LA FEUILLE DE MURIER - APPROCHE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

La surface de la feuille détermine l'adaptation du mûrier à différents environnements et l'échange de vapeur d'eau, de CO_2 et d' O_2 à travers les pores des stomates. La couche duveteuse des trichomes sur l'épiderme détermine la transpiration épidermique et la dépense d'énergie des feuilles. Une pubescence dense des trichomes des plantes change les propriétés optiques de la surface de la feuille et peut refléter ou absorber certaines longueurs d'onde de lumière (Southwood, 1986). Les stomates contrôlent l'assimilation et la transpiration par la taille des pores, ainsi les stomates jouent un rôle vital dans le contrôle de l'équilibre entre la perte en eau et le gain de carbone, c'est à dire la production de biomasse. Singhal et coll. (1999 d) ont étudié la taille et le nombre des stomates, d'idioblastes et des trichomes de dix génotypes de mûrier, Tr-10, K-2, S-36, S-54, S-1, V-1, Mysore local, S-13, S34 et RFS-135 sous un microscope électronique à balayage. D'après leur taille et leur nombre, les stomates sont regroupés dans 3 catégories. La plus grande taille de stomates ($13,251 \pm 0,005 \mu\text{m}$ de longueur et $5,527 \pm 0,008 \mu\text{m}$ de largeur) est observée chez le génotype Tr-10 mais ils sont moins importants en nombre (3 à 4 stomates) sur une surface de $1333,2 \mu\text{m}^2$ parmi dix génotypes prometteurs. Le génotype S-13 qui présente un taux photosynthétique de $20,88 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a les stomates les plus petits ($8,034 \pm 0,004 \mu\text{m}$ de longueur et $4,751 \pm 0,007 \mu\text{m}$ de largeur) sur les 10 génotypes mais ils sont modérément plus élevés en nombre ($5,90 \pm 0,22$ par surface de $1333,2 \mu\text{m}^2$). Chez les 10 génotypes étudiés, les trichomes s'avèrent glandulaires. Le génotype S-13 ayant le « A » le plus élevé a de très petits trichomes dont la longueur est de $18,24 \pm 0,32 \mu\text{m}$. La relation entre la surface foliaire et la photosynthèse chez le mûrier nécessite des recherches supplémentaires.

FORMES DE LA FEUILLE, INTERCEPTION DE LA LUMIERE ET PHOTOSYNTHESE

Smith et coll., (1997) ont expliqué que de nombreux paramètres structurels de la feuille entière influencent la photosynthèse par des effets sur le captage de la lumière à la surface de la feuille, tout comme sur sa propagation et son atténuation à l'intérieur de la feuille. Ces adaptations structurelles sont fortement liées à l'orientation de la feuille et au soleil présent sur les deux surfaces de la feuille (Tableau XIV, fig. 1). Le fait que les feuilles recevant du soleil sont plus épaisses et l'asymétrie structurelle correspondante en fonction de l'inclinaison de la feuille prouvent fortement que l'orientation et la structure de la feuille influencent le flux de lumière et d'oxyde de carbone au niveau de toute la feuille. Dans le cas d'une feuille umbrophile caractéristiquement fine, la lumière et non pas l'approvisionnement en CO_2 est la limitation principale de la photosynthèse. Cette zone optimum d'intersection entre la lumière et le CO_2 est peut être plus large et plus près du centre de la feuille.

Dix génotypes de mûrier prometteurs S-34, S-13, S-54, RFS-135, S-1, TR10, S-799, S-36, K-2 et Mysore local ont une orientation de la feuille horizontale ou verticale avec une morphologie de feuille petite et cylindrique ou grande, large et laminaire. Les feuilles de S-13 sont comparativement plus épaisses que celles de tous les autres génotypes et il a le nombre le plus élevé de feuilles par plant (environ 288) bien que leur taille soit inférieure. La distance internodale est aussi significativement

inférieure. L'orientation des feuilles est horizontale chez ce génotype. Aucune information n'est disponible sur la relation entre l'orientation de la feuille et le taux de photosynthèse chez le mûrier.

Ito (1995) a observé dans au Japon, qu'une population de mûrier à forte densité est plus productive aux premiers stades de croissance parce que le feuillage est uniforme et peut intercepter plus de lumière. Cependant, aux derniers stades, les plantation deviennent moins productives et une défoliation sévère se produit à cause de la faible quantité de lumière présente sur les feuilles les plus basses à cause de l'étrécissement de l'espace. Ito a conclu que la productivité plus élevée des populations de mûrier plantés en fortes densités est due à la meilleure interception de la lumière aux premiers stades de croissance et que les pousses doivent être taillées tôt pour éviter une croissance trop luxuriante. Une taille précoce d'une population densément plantée, si elle est faite à la bonne hauteur, peut non seulement stopper une croissance trop luxuriante mais aussi améliorer l'interception de la lumière, ce qui entraîne une augmentation considérable de l'assimilation de CO_2 . On a aussi noté une relation proportionnelle entre la radiation solaire interceptée et la production de matière sèche dans les mûraies (Aqueel, 1999).

INFLUENCE DES PRATIQUES DE CULTURE ET DES REGULATEURS DE CROISSANCE SUR LA PHOTOSYNTHESE DE LA FEUILLE

L'effet de différentes méthodes culturales sur la photosynthèse a été étudié chez les deux variétés les plus populaires, V-1 et S-36 pour trouver une méthode idéale avec un taux de photosynthèse et un rendement élevés. Le taux photosynthétique le plus élevé de $23,42 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ est enregistré avec la méthode indo-japonaise de système d'espacement « IJS » ($90 \times 180 \times 60 \text{ cm}$) chez la variété V-1. Chez la même variété, on obtient un taux de photosynthèse de $23,42 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec la méthode où les engrais azotés et phosphorés sont réduits respectivement de 50 % et de 75 % et remplacés par 20 kg d'engrais biologiques bactériens par ha/année + mycorhizes + vaporisation de n-triacontanol avec l'espacement « IJS » (Tableau XV). De même, le ratio « A »/Sc est presque le même dans les deux cas. Le fait que le ratio ICO_2/Sc soit plus faible dans le dernier cas reflète l'efficacité du mésophylle avec cette méthode. Cependant, le génotype S-36 a un taux photosynthétique élevé avec la méthode indienne (espacement de $60 \times 60 \text{ cm}$) et 300:120:120 kg d'application par ha/année d'engrais N, P et K. Ainsi, la plus grande interception de lumière et l'application d'engrais biologique + VAM + triacontanol influencent remarquablement le taux de photosynthèse chez la variété V-1 avec des applications très faibles de N et de P mais pas chez S-36. L'étude indique que ce mode de pratiques est spécifique à la variété, une méthode courante ne peut pas être suivie parce que le type de plantes et le potentiel génétique diffèrent par rapport à l'absorption et à la conversion. Les hormones ou les régulateur des plantes sont impliqués dans la régulation du développement physiologique par leur action sur le site de production et aussi par leur transport vers d'autres sites. Ces activités peuvent influencer la photosynthèse. Ries et coll. (1977) ont isolé une substance cristalline dans la fraction active de la luzerne. Elle a augmenté le poids sec et l'absorption d'eau de plantules de riz lorsqu'on la vaporise sur tout le feuillage ou quand on l'administre dans le milieu nutritif. La substance trouvée est le « triacontanol ». Eriksen et coll. (1981) ont observé que la différence de réponse des plantes C_3 et C_4 au triacontanol indique qu'il régule des procédés liés à la photosynthèse. Menon et Srivastava (1984) ont analysé l'importance de l'augmentation de la productivité des plantes par la photosynthèse en utilisant des alcools à chaîne aliphatique plus élevée.

Les expériences sur l'utilisation de régulateurs de croissance révèlent une augmentation significative du taux de photosynthèse ($11,8 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) chez les plants vaporisés avec du Planofix pour la variété S-1, suivis par Biozyme + Miraculan et Vipul, par comparaison à $8,6 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez le témoin (Das et Setua 1994). De même, une augmentation du rendement en feuilles de 34, 28, 20 et 8 % a été enregistrée chez des plantes vaporisées respectivement avec du Planofix, du Biozyme, du Miraculan et du Vipul (Tableau XVI).

INFLUENCE DE LA NUTRITION MINERALE SUR LA PHOTOSYNTHESE

Le potentiel génétique du mûrier ne peut être pleinement exploité dans le cadre des contraintes que représentent le lieu et le climat que si l'on maintient une quantité adéquate et continue d'eau et de minéraux nécessaires pour la production de biomasse. Le taux en nutriments doit correspondre au taux d'assimilation, de sorte que le taux fourni augmente en même temps que le taux d'assimilation par les plantes. Chakraborti a bien étudié l'importance de la nutrition minérale sur la croissance de la plante et sur les processus physiologique et biochimique du mûrier (1996c). L'importance des nutriments chez le mûrier a été détaillée par Singhal et Mala (1998). Singhal et coll., (1999e) ont remarqué une chute brutale du taux de photosynthèse et des autres paramètres d'échange de gaz chez le mûrier en l'absence de nutriments minéraux (Tableau XVII). En cas de manque en P, K, Mg et fer, les paramètres d'échange de gaz sont sévèrement touchés. L'efficacité du mésophyle baisse considérablement en cas de manque en nutriment. Singhal et coll., (1999a, b) ont aussi étudié le changement du taux de photosynthèse avec des doses différentes de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn et zinc pendant qu'ils en décelaient les niveaux critiques pour des échanges de gaz et un rendement en feuilles élevés. Les niveaux critiques par rapport aux besoins en N, P, K, Ca, Mg, S, B, cuivre, fer, Mn et zinc sont de 350 kg/ha/an, 100 kg/ha/année, 100 kg/ha/année, 0,25 % ; 0,15 % ; 0,28 % ; 0,45 % ; 0,55 % ; 0,11 % ; 0,16 % et 0,24 %, respectivement pour un taux de photosynthèse élevé (Tableaux XVIII - XIX). Le rendement en feuilles est aussi plus élevé avec ces niveaux critiques de nutriments (Singhal et coll., 1999 a, b). Les effets du manque ou de l'excès de nutriments sur la photosynthèse ont été rapportés par Mareshner (1995) et Bergmann, (1992) chez des cultures variées. Kumar et Sharma (1995) ont observé une baisse de la photosynthèse dans les feuilles de mûrier en cas de manque en phosphore.

INFLUENCE DE L'INTERACTION CHIMIQUE DES MAUVAISES HERBES SUR LA PHOTOSYNTHESE

L'étude des interactions chimiques et des allelo-substances chimiques a donné naissance à un nouveau domaine de l'eco-physiologie chimique appelée « allélopathie ». Récemment Waller (1998) a défini l'allélopathie comme n'importe quel processus impliquant des métabolites secondaires produits par des plantes, des algues, des bactéries, des champignons et des virus qui influencent la croissance et le développement des systèmes agricoles et biologiques ; et comme l'étude des fonctions des métabolites secondaires, leur signification dans l'organisation biologique, leur origine évolutionniste et l'explication des mécanismes impliquant des interactions plante - plante, plante-micro-organismes, plante-virus, plante-insecte et plante-sol-plante. Un type de substances chimiques par lesquelles l'organisme d'une espèce a des effets sur la croissance, la santé et le comportement biologique d'une population d'une autre espèce est appelé substance allelo-chimique. La tendance actuelle par rapport à la productivité agricole est de diminuer l'utilisation d'engrais chimiques et de passer à des substances allelo chimiques naturelles. Singhal et coll., (1998) ont rapporté une augmentation de 22,90 % du taux photosynthétique chez la feuille de mûrier traitée avec 5 % d'extraits de tubercule de *Cyperus rotundus* (Tableau XX). De même, ils ont obtenu une augmentation du rendement en feuilles de 32,91 %. Il a été suggéré d'utiliser 5 % d'extraits de tubercule de *C. rotundus* pour améliorer le taux de photosynthèse et par conséquent le rendement en feuilles et la qualité du mûrier. On ne dispose d'aucune information sur d'autres plantes ayant un effet similaire sur le mûrier.

CONCLUSION

L'étude réalisée sur différents aspects révèle que la productivité de la récolte de mûrier peut être améliorée, grâce à une amélioration de la photosynthèse du fait de la relation étroite entre le taux

photosynthétique et le rendement. De nombreuses études doivent être réalisées sur la variation de la photosynthèse du mûrier dans différentes conditions de stress. Le taux de photosynthèse des génotypes disponibles dans la banque génétique doit être évalué avec soin par rapport au rendement en feuilles et à d'autres paramètres importants comme l'inclinaison, la structure de la feuille et les caractères liés. Comme nous l'avons observé, le syndrome C4 nécessite une étude précise chez les génotypes prometteurs pour une utilisation efficace en tant que parents potentiels dans des programmes de sélection. Des programmes de lignage plus efficaces pourraient être ébauchés grâce aux informations obtenues, pour mettre au point des variétés à haut rendement au taux de photosynthèse plus élevé. Une variété adaptée aux méthodes doit être programmée pour imposer les caractères assimilateurs dans des zones écoclimatiques différentes. Des génotypes photosynthétiquement efficaces adaptés à des conditions de stress hydrique doivent être mis au point. Parmi les génotypes étudiés, S-13 apparaît comme le génotype photosynthétiquement le plus efficace pour être utilisé dans des programmes variés d'amélioration des récoltes, compte tenu de son taux photosynthétique élevé, de son faible ratio L/D et de son incorporation de $^{14}\text{CO}_2$ et de son rendement en feuilles plus élevés. Entre-temps, compte tenu de la possibilité d'un syndrome C4 chez TR10, TR10 pourrait être cultivé dans des zones différentes grâce à sa meilleure utilisation de l'énergie solaire. Comme des corrélations positives ont été observées entre la photosynthèse de la feuille et le potentiel de rendement de certains génotypes de mûrier, des études supplémentaires sont nécessaires chez de nombreux exemplaires de germoplasmes. Si cela est confirmé, cela pourrait servir d'indice utile dans des programmes futurs d'amélioration des récoltes de mûrier, en sélectionnant des génotypes ayant une plus grande efficacité photosynthétique. Des études supplémentaires dans cette direction pourraient être un outil important pour exploiter la photosynthèse afin d'améliorer la productivité de la récolte du mûrier dans des zones éco-climatiques variées.

STUDY ON THE COCOON COLOUR SEGREGATION MANIFESTED IN HYBRIDS BETWEEN UNI-BIVOLTINE AND MULTIVOLTINE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. RACES

P. TZENOV, Y. NACHEVA & N. PETKOV

Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov str., Vratza 3000 Bulgaria.

The F1, F2, F3, BC, F2 of BC and the cross of BC with the unibivoltine parent hybrids between the uni-bivoltine Bulgarian pure lines Super 1 and Hessa 2 with white cocoons and the tropical polyvoltine race Bonde 517 having yellowgreen coloured cocoons have been used in this study. The results obtained manifested that the coloured cocoons trait dominated over the character white cocoons in F1. In the F2 generation the segregation was 3 parts coloured and one part white cocoons. In BC, with the homozygote recessive parent the segregation obtained was 1 part coloured and 1 part white cocoons. In F3, F2 of BC and the cross of BC with the unibivoltine parent the segregations obtained were 3 parts coloured, 1 part white cocoons, 1 part coloured and 1 part white cocoons, all coloured and all white cocoons. The coloured cocoons in F2 and F3 had different nuances. Considering the data obtained it is possible to suggest that the genes probably responsible for the cocoon colour in these hybrids are presented as multialleles in the population of the multivoltine race, Bonde 517 which causes the different nuances in the cocoon colour in F2 and F3.

Cocoons having pure white colour without any nuances can be selected successfully for the breeding purposes in F2, F3, BC, F2 of BC and the cross of BC with the unibivoltine parent without any danger to appear segregation in the following generations.

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., cocoon colour, uni-bi x multivoltine hybrids, segregation.

INTRODUCTION

One of the main reasons to obtain comparatively low cocoon yield at farmer's level in the recent years in Bulgaria, is that most of the farmers are not able to provide the optimal rearing conditions during the larval period. Taking into account this problem the attention of the silkworm breeders has been directed to selection of hybrids having an underlined tolerance to adverse rearing conditions and physical stress.

One of the most common methods to improve the sturdiness of the uni and bivoltine races is by using some tropical polyvoltine races as sources of genes for higher tolerance (Kim, 1987; Murakami and Ohtsuki, 1989; Maribashetty and Sreenama Reddy, 1995).

Besides their sturdiness, the tropical races manifest some undesired qualitative characters like coloured and spindle-shaped cocoons with a wooly structure causing troubles in the breeding process.

Considering the great importance of this problem the present study has been undertaken in order to investigate the segregation of cocoon colour trait in hybrids between Bulgarian, the most important now pure lines Super 1 and Hessa 2 and the tropical multivoltine race Bonde 517.

MATERIAL AND METHODS

The experimental work has been undertaken during the period of 1995-1997 at the Sericultural Experiment Station of Vratza. The Bulgarian pure lines Super 1 and Hessa 2 and the tropical race Bonde 517 have been used in the study. The Super 1 line was originated from the Japanese strain N 124 which had been introduced into Bulgaria since 1971. The line is uni-bivoltine with white cocoons having a constricted shape. The origin of the Hessa 2 stock is from the Japanese line Hosho which had been introduced in Bulgaria since 1971. The line has oval white cocoons and is bivoltine. Both stocks are used as parental pure lines of the widely adopted in the field Bulgarian commercial hybrid Super 1 x Hessa 2 and the reciprocal.

The race Bonde 517 has been introduced into Bulgaria since 1988 through North Korea. However, it is a typical multivoltine strain and its native origin is from South-East Asia. Bonde 517 spins light yellow-green cocoons with wooly structure, however the population of the race is not homogenous with respect to the cocoon colour intensity: there are some cocoons with dark yellowgreen colour, some cocoons with very light yellowgreen colour and a lot of cocoons with negligible differences of the cocoon intensity between them.

The following crosses between the races were analysed:

Super 1 (Hessa 2) x Bonde 517 - F1

Bonde 517 x Super 1 (Hessa 2) - F1

Super 1 (Hessa 2) x Bonde 517 - F2

Bonde 517 x Super 1 (Hessa 2) - F2

(Super 1 (Hessa 2) x Bonde 517) x Super 1 (Hessa 2) - BC

(Super 1 (Hessa 2) x Bonde 517) x Bonde 517 - BC

(Super 1 (Hessa 2) x Bonde 517) x Super 1 (Hessa 2) -F2 of BC

Super 1 (Hessa 2) x Bonde 517 - F3

(Super 1 (Hessa 2) x Bonde 517) x Super 1 (Hessa 2) x Super 1 (Hessa 2) - BC x unibivoltine parent.

The F2, F3 and the F2 of the backcross (BC) were obtained by inbreeding. From two to three layings (families) of each race and hybrid have been reared under the standard technology (Petkov, 1972).

The cocoons spun by each race, hybrid and laying have been harvested separately, dried, cleaned from the floss and divided according to their colour in two groups, namely coloured and white cocoons respectively.

The group of the white cocoons included only those having typical white colour without any nuances.

The cocoons of each group were counted and the percentage of the coloured and white cocoons was calculated towards the whole amount of cocoons into the laying. Then the correlation between the phenotypic segregation of the cocoon colour and the theoretically expected one has been expressed by the criterion-chi-square and the data significance is determined according to Fisher (Rokitzkii, 1978).

RESULTS

The results obtained are shown in Tables I and II. As we pointed out in a previous paper (Tzenov *et al.*, 1997), all the cocoons in F1 were darkgreen-yellow coloured. It is evident from both Tables that in F2 there appears a segregation ratio, namely 3 parts coloured and 1 part white cocoons.

Table 1. Segregation of the cocoon colour character in the crosses between Super 1 and Bonde 517 races.

Tableau 1. Ségrégation du caractère couleur des cocons, chez les croisements entre les races Super 1 et Bonde 517.

Crosses	Nber of laying (family)	Nber of cnecons / laying	Cocoon colour in the offspring				Theoretically expected segregation	χ^2 chi square	P
			Coloured		White				
			Number	%	Number	%			
Croisements	Nbre de pontes (famille)	Nbre de cocons / ponte	Couleur des cocons de la descendance				Ségrégation attendue théoriquement	χ^2	P
			Colorée		Blanche				
			Nombre	%	Nombre	%			
Super 1 x Bonde 517 F ₂	1	540	402	74.44	138	25.56	3:1	0.088	0.90>P>0.75
	2	573	428	74.69	145	25.31	3:1	0.039	0.90>P>0.75
	3	489	363	74.23	126	25.77	3:1	0.175	0.75>P>0.50
Bonde 517 x Super 1 F ₂	1	391	292	74.68	99	25.32	3:1	0.013	0.95>P>0.90
	2	494	365	73.89	129	26.11	3:1	0.270	0.75>P>0.50
	3	433	323	74.60	110	25.40	3:1	0.049	0.90>P>0.75
(Super 1 x Bonde 517) x Super 1	1	453	221	48.79	232	51.21	1:1	0.268	0.75>P>0.50
	2	568	275	48.42	293	51.58	1:1	0.570	0.50>P>0.25
	3	457	232	50.77	225	49.23	1:1	0.107	0.75>P>0.50
(Super 1 x Bonde 517) x Bonde 517	1	509	509	100.00	—	—	1	—	—
	2	482	482	100.00	—	—	1	—	—
(Super 1 x Bonde 517) x Super 1 + F ₂	1	623	458	73.52	165	26.48	3:1	0.260	0.75>P>0.50
	2	588	294	50.00	294	50.00	1:1	—	—
Super 1 x Bonde 517 F ₃	1	507	264	52.07	243	47.93	1:1	0.954	0.50>P>0.25
	2	506	391	77.27	115	22.73	3:1	0.478	0.50>P>0.25
(Super 1 x Bonde 517) x Super 1 x Super 1	1	553	289	52.26	264	47.74	1:1	1.042	0.50>P>0.25
	2	528	—	—	528	100.00	1	—	—

Table II. Segregation of the cocoon colour character in the crosses between Hessa 2 and Bonde 517 races.**Tableau II. Ségrégation du caractère couleur des cocons chez les croisements entre les races Hessa 2 et Bonde 517**

Crosses	Nber of laying (family)	Nber of cocoons / laying	Cocoon colour in the offspring				Theoretically expected segregation	χ^2 chi square	P
			Coloured		White				
			Number	%	Number	%			
Croisements	Nbre de pontes (famille)	Nbre de cocons par ponte	Couleur des cocons de la descendance				Ségrégation théorique attendue	χ^2	P
			Colorée		Blanche				
			Nombre	%	Nombre	%			
Hessa 2 x Bonde 517	1	606	450	74.26	156	25.74	3:1	0.061	0.50>P>0.25
F ₂	2	534	395	73.97	139	26.03	3:1	0.240	0.75>P>0.50
	3	437	330	75.51	107	24.49	3:1	0.049	0.50>P>0.25
Bonde 517 x Hessa 2-F ₂	1	342	253	73.98	89	26.02	3:1	0.139	0.25>P>0.25
(Hessa 2 x Bonde 517)	1	581	282	48.54	299	51.46	1:1	0.497	0.50>P>0.25
x Hessa 2	2	568	289	50.88	279	49.12	1:1	0.176	0.75>P>0.45
	3	404	200	49.50	204	50.50	1:1	0.080	0.90>P>0.75
(Hessa 2 x Bonde 517)	1	621	621	100.00	—	—	1	—	—
x Bonde 517	2	598	598	100.00	—	—	1	—	—
	3	491	491	100.00	—	—	1	—	—
(Hessa 2 x Bonde 517)	1	529	263	49.72	266	50.28	1:1	0.018	0.95>P>0.90
x Hessa 2 = F ₂	2	560	277	49.46	283	50.54	1:1	0.064	0.90>P>0.75
Hessa 2 x Bonde 517	1	537	537	100.00	—	—	1	—	—
F ₃	2	551	551	100.00	—	—	1	—	—
(Hessa 2 x Bonde 517)	1	493	258	52.33	235	47.67	1:1	1.074	0.50>P>0.25
x Hessa 2 x Hessa 2	2	600	334	55.67	266	44.33	1:1	7.706	0.01>P>0.00

The coloured cocoons in F2 and F3 had different nuances, namely darkyellowlightgreen, darkgreenlightyellow and lightyellowgreen with a lot of transition forms. There were also differences between the different layings with respect to the nuances of the coloured cocoons.

In the backcrosses (BC) with the white cocoon races Super 1 and Hessa 2, a segregation 1 part coloured and one part white cocoons was observed, while in the backcrosses with Bonde 517 all the cocoons were coloured.

Different segregation ratios, namely 3: 1, 1: 1 and 1 have been obtained in F2 of BC, F3 and the cross of BC with the unibivoltine parent.

Except for one of the three layings of the second backcross of Hessa 2 in all the other hybrids and layings the correlation between the theoretically expected and the really obtained phenotypic segregation was very high and proved statistically.

DISCUSSION

It is a well-known fact that there are a lot of genes and multialleles responsible for the cocoon colour segregation (Tazima, 1964). The main cocoon colours are yellow, golden yellow, pink, flesh, green and colourless or white. According to Lim *et al.*, (1995), the yellow and pinkish colours are due to carotinoids, carotens and xanthophyll from the mulberry leaves. These colours are secreted from the middle silk gland and pigmented in sericine. The green colour originates from the flavonoids and is secreted from the middle and posterior silk gland both. Taking into account that the carotinoids and xanthophyll have different biochemical structure compared to the flavonoids, it could be supposed that different genes are responsible for the yellow and for the green colours.

Kovalev and Sheveleva (1966) reported that the silkworm larvae having yellow haemolymph could spin yellow as well as white cocoons, however the larvae with colourless haemolymph were able to spin white cocoons only.

According to Lim *et al.*, (1995), who cited some Japanese authors the known genes, responsible for yellow coloured cocoons are C - golden yellow, Cd - light yellow, Ci - inner layer yellow, dy - dilute yellow, Y - Yellow blood, Ya - mandarina yellow blood, Yc - yellow cocoon, Yf - yellow fluorescent and Yr - yellow brown.

Tazima (1964) reported that the gene Y was responsible for the yellow blooded larvae and yellow cocoon and was located on the second chromosome, 25.6 locus. The genes I and Is are known as yellow inhibitors which completely suppress Y and are responsible for the white cocoon.

According to Lea (1993), the genes responsible for the green cocoon are Ga, Gb and Gc. Since Bonde 517 race has yellowgreen coloured cocoons it could be supposed that this race contains in its genom the genes responsible for yellow cocoon and for the green cocoon both or there is another single gene responsible for yellowgreen coloured cocoons.

Our results obtained manifested that in the all crosses studied the real phenotypic segregation corresponded significantly with the theoretically expected one. The results indicated also that if we cross moths emerged from white cocoons of F2 and BC the offsprings would have also only white cocoons without any segregation.

As we mentioned above Bonde 517 race was not homogenous with respect to the cocoon colour intensity. The results obtained manifested that in the F1 crosses between Bonde 517 and Super 1 and Hessa 2 pure lines all the cocoons were greenyellow and darker than those of Bonde 517 race.

The groups of the coloured cocoons in F2, F3 and F2 of BC crosses were consisted of cocoons having different nuances of the yellowgreen colour. The results obtained allow us to suppose that the Bonde 517 population contains in its genom several multialleles of the genes responsible for the different intensity of the yellow pigments of the cocoons. It is also possible one independent gene to have multiallelism as well. The new colour obtained in F1 could be explained by the different

interactions between the dominant alleles with the recessive one in the heterozygotes compared to homozygotes. The different intensity of the cocoon colour in F2 and F3, we explain by the combinations between the different multialleles and by the different dominant-recessive interactions between the different dominant multialleles and the recessive allele. The crossing-over occurring between the multialleles could be also probably involved in this process.

Raju and Krishnamurthy (1993) reported from their crossing experiment with the multivoltine race Pure Mysore having green cocoons with the white cocoon bivoltine hybrid NB4D2 x NB7 that in F1, all the cocoons were green and in F2 the segregation in the cocoon colour was green, pale yellow, dull white and white. Different nuances in the cocoon colour were detected also in this experiment.

From the results obtained, it can be concluded that the coloured cocoon character dominated over the white cocoon character in F1. In F2, the segregation was 3 parts coloured and 1 part white cocoons. In the BC with the homozygote recessive parent the segregation obtained was 1 part coloured and 1 part white cocoons.

In F3, F2 of BC and the cross of BC with the unbivoltine parent, the segregations obtained were 3 parts coloured, 1 part white cocoons, 1 part coloured and 1 part white cocoons, all coloured and all white cocoons.

The coloured cocoons in F2 and F3 had different nuances.

Based on the data obtained it could be supposed that one or several genes probably responsible for the cocoon colour are presented as multialleles in Bonde 517 population, what was the reason for the different nuances in the cocoon colour.

A further investigation should be made in order to detect the exact genes responsible for the cocoon colour in the multivoltine race.

Cocoons with pure white colour without any nuances can be selected for the purposes of breeding in F2, F3, BC, F2 of BC and the cross of BC with the unbivoltine parent without any danger to appear segregation in the following generations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Bulgarian National Science Fund for the financial support to undertake this study.

REFERENCES

- KIM L. T. (1987) Evolution of bivoltine strain of silkworm (*Bombyx mori* L.) for summer rearing in Vietnam. *Sericologia*, 27 (3): 437.
- KOVALEV P. A. & SHEVELEVA A. A. (1966) Silkworm breeding and egg production, Uchitel, Tashkent, 191 pp.
- LEA H. Z. & LEE S. P. (1981) Genetic organization of the larval marking genes in *Bombyx mori* L. I. Evidence for pseudoallelic multigene clusters on the origin of the chromosome II. *Korean J. Breed*, 28 (2): 252-256.
- LEA H. Z. (1993) Principles and techniques of silkworm breeding. United Nations, New York, 114 pp.
- LIM S. H. *et al.*, (1995) Principles and practices in sericulture. NSERI, RDA, 788 pp.
- MARIBASHETTY V. G. & SREERAMA REDDY G. (1995) Breeding of a robust bivoltine line, MU 720 of the silkworm, *Bombyx mori* L., for the tropics, *Sericologia*, 35 (2): 203-212.
- MURAKAMI A. & OHTSUKI Y. (1989) Genetic studies on Tropical race of silkworm, *Bombyx mori* L., with special reference to cross breeding strategy between tropical and temperate races. I. Genetic nature of the tropical multivoltine strain Cambodia, *Japanese Agricultural Research Quarter*, 23 (1): 37-45.

- PETKOV M. (1972) Study on the effect of some environmental conditions on the silkworm, *Bombyx mori* L., development and productivity, PhD thesis Higher Agricultural Institute, Plovdiv, 44 pp (Bg).
- RAJU P. J. & KRISHNAMURTHY N. B. (1993) Breeding of two bivoltines, MG 511 and MG 512 of silkworm, *Bombyx mori* L., for higher viability and silk productivity, *Sericologia*, 33 (4): 577-587.
- ROKITZKII P. (1978) Introduction in the statistical genetics, Minsk. 144 pp.
- TAZIMA Y. (1964) The genetics of the silkworm. Logos Press. 253 pp.
- TZENOV P., NACHEVA Y. & PETKOV N. (1997) Study on the cocoon colour and cocoon shape characters inheritance in F1 crosses between unbivoltine and multivoltine races of the silkworm, *Bombyx mori* L., *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 3, 181-185.

LA SEGREGATION DE LA COULEUR DES COCONS CHEZ DES HYBRIDES ENTRE VERS A SOIE (*BOMBYX MORI*) MONO-BIVOLTINS ET POLYVOLTINS

P. TZENOV, Y. NACHEVA & N. PETKOV

Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Str., Vratza 3000, Bulgarie.

Les F1, F2, F3, croisements de retour (BC), les F2 de croisements de retour et les croisements entre BC et les hybrides mono-bivoltins obtenus entre les lignées pures unibivoltines bulgares Super 1 et Hessa aux cocons blancs et la race tropicale polyvoltine Bonde 517 aux cocons jaune vert ont été utilisés dans cette étude. Les résultats obtenus suggèrent que le trait de cocons colorés domine par rapport au caractère de cocons blancs en F1. Dans la génération F2, la ségrégation obtenue conduit à 3/4 de cocons colorés et 1/4 de cocons blancs. Dans les BC avec le parent homozygote récessif, la ségrégation conduit à 50 % de cocons colorés et 50 % de cocons blancs. En F3, F2 de BC et dans le croisement de BC avec le parent unibivoltin, les ségrégations obtenues sont respectivement de 3/4 colorés pour 1/4 blancs, 50 % de cocons blancs 50% de colorés, tous les cocons colorés et tous les blancs. Les cocons colorés dans les F2 et F3 ont différentes nuances.

Compte tenu des données obtenues, il est possible de suggérer que les gènes responsables de la couleur des cocons chez ces hybrides sont sous forme multiallélique dans la population de la race polyvoltine Bonde 517, ce qui entraîne différentes nuances de couleur du cocon en F2 et F3.

Des cocons purement blancs sans aucune nuance peuvent être sélectionnés avec succès à des fins de breeding dans les F2, F3, BC, F2 de BC et le croisement de BC avec le parent unibivoltin sans qu'il y ait de risque de nouvelle ségrégation dans les générations suivantes.

INTRODUCTION

Une des principales raisons pour lesquelles les sériciculteurs obtiennent de faibles rendements en cocons en Bulgarie est due à leur incapacité à fournir des conditions d'élevage optimum pendant la période larvaire. Compte tenu de ce problème, l'attention des sélectionneurs de vers à soie s'est portée vers la sélection d'hybrides tolérants bien des conditions d'élevage adverses et des stress physiques.

Une des méthodes les plus courantes pour améliorer la robustesse de races mono et bivoltines consiste à utiliser des races polyvoltines tropicales comme sources de gènes à tolérance élevée (Kim, 1987 ; Murakami et Ohtsuki, 1989 ; Maribashetty et Sreerama Reddy, 1995).

Malgré leur robustesse, les races tropicales ont des caractères qualitatifs indésirables tels que des cocons colorés et cintrés, à la structure laineuse qui entraînent des problèmes dans le processus de lignage.

Compte tenu de l'importance considérable de ce problème, l'étude présente a été entreprise afin d'étudier la ségrégation de la couleur du cocon chez des hybrides entre les lignées pures bulgares les plus importantes Super 1 et Hessa 2 et la race polyvoltine tropicale Bonde 517.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences ont été entreprises de 1995 à 1997 à la Station Expérimentale Sériceicole de Vratza. Les lignées pures bulgares Super 1 et Hessa 2 et la race tropicale Bonde 517 ont été utilisées dans cette étude. La lignée Super 1 provient de la souche japonaise N124 qui a été introduite en Bulgarie en 1971. La lignée est mono-bivoltine avec des cocons blancs de forme étroite. La souche Hessa 2 vient de la lignée japonaise Hosho qui a été introduite en Bulgarie en 1971. La lignée a des cocons blancs ovales et est bivoltine. Les deux souches sont utilisées comme lignées parentales pures de l'hybride commercial bulgare largement utilisé sur le terrain Super 1 $\times$ Hessa 2 et réciproquement.

La race Bonde 517 a été introduite en Bulgarie en 1988 et vient de la Corée du Nord. C'est une souche polyvoltine typique et son origine natale est l'Asie du Sud Est. Bonde 517 file des cocons jaune vert clair à la structure laineuse, cependant la population n'est pas homogène par rapport à l'intensité de la couleur du cocon : il y a des cocons jaune vert foncé, des cocons jaune vert très clairs et beaucoup de cocons avec des différences négligeables d'intensité entre eux.

Les croisements suivants ont été analysés :

Super 1 (Hessa 2) $\times$ Bonde 517 - F1

Bonde 517 $\times$ Super 1 (Hessa 2) - F1

Super 1 (Hessa 2) $\times$ Bonde 517 - F2

Bonde 517 $\times$ Super 1 (Hessa 2) - F2

(Super 1 (Hessa 2) $\times$ Bonde 517) $\times$ super 1 (Hessa 2) - BC

(Super 1 (Hessa 2) $\times$ Bonde 517) $\times$ Bonde 517 - BC

(Super 1 (Hessa 2) $\times$ Bonde 517) $\times$ Super 1 (Hessa 2) - F2 de BC

Super 1 (Hessa 2) $\times$ Bonde 517 - F3

(Super 1 (Hessa 2) $\times$ Bonde 517) $\times$ Super 1 (Hessa 2) $\times$ Super 1 (Hessa 2) - BC $\times$ parent monobivoltin.

Les F2, F3 et la F2 du retrocroisement (BC) sont obtenues par élevage consanguin. Deux à trois pontes (familles) de chaque race et hybride sont élevées d'après la technologie standard (Petkov, 1972).

Les cocons sont récoltés séparément, séchés, nettoyés de leur bourre et séparés en deux groupes en fonction de leur couleur, à savoir respectivement les cocons colorés et blancs.

Le groupe de cocons blancs comprend seulement ceux qui ont une couleur blanche typique sans aucune nuance.

Les cocons de chaque groupe sont comptés et le pourcentage de cocons colorés et blancs est calculé par rapport à la quantité totale de cocons dans la ponte. Puis la corrélation entre la ségrégation phénotypique de la couleur du cocon et la couleur théoriquement attendue est exprimée par le critère de chi-carré et la signification des données est déterminée selon Fisher (Rokitzkii, 1978).

RESULTATS

Les résultats obtenus sont présentés dans les Tableaux I et II. Comme nous l'avons souligné dans un article précédent (Tzenov et coll., 1997), tous les cocons en F1 sont jaune vert foncé. Il est évident d'après les deux tableaux qu'il apparaît un ratio de ségrégation en F2, en l'occurrence trois parties de cocons colorés et une partie de cocons blancs.

Les cocons colorés en F2 et F3 ont des nuances différentes, en l'occurrences jaune foncé vert clair, vert foncé jaune clair et vert jaune clair avec de nombreuses transitions. Il y a aussi des différences entre les pontes différentes par rapport aux nuances des cocons colorés.

Dans les retrocroisements (BC) avec les races à cocons blancs Super 1 et Hessa 2, on observe un isolement avec une partie de cocons colorés et une partie de cocons blancs, tandis que dans les retrocroisements avec Bonde 517 tous les cocons sont colorés.

Différents ratios de ségrégation en l'occurrence 3:1; 1: 1 et 1 ont été obtenus en F2 de BC, F3 et le croisement de BC avec le parent monobivoltin.

La corrélation entre la ségrégation théoriquement attendue et la ségrégation phénotypique réellement obtenue est élevée et prouvée statistiquement pour les trois pontes sauf une du second retcroisement de Hessa 2 et chez tous les autres hybrides et pontes.

DISCUSSION

Il est bien connu que de nombreux gènes et multiallèles sont responsables de la couleur du cocon (Tazima, 1964). Les couleurs principales des cocons sont jaune, jaune doré, rose, chair, vert et non coloré ou blanc. Selon Lim et coll. (1995), les couleurs jaunes et roses sont dues aux caroténoïdes, aux carotènes et au xanthophylle des feuilles de mûrier. Ces couleurs sont sécrétées par la glande séricigène moyenne et pigmentent la sérécine. La couleur verte vient des flavonoïdes et est sécrétée à la fois par la glande séricigène moyenne et par la glande postérieure. Puisque les caroténoïdes et le xanthophylle ont une structure biochimique différente comparée aux flavonoïdes, on peut supposer que des gènes différents sont responsables des couleurs jaune et vert.

Kovalev et Sheveleva (1966) ont signalé que les larves de ver à soie ayant une hémolymph jaune peuvent filer des cocons jaunes et blancs, cependant les larves dont l'hémolymph est incolore ne peuvent filer que des cocons blancs.

Selon Lim et coll., (1995) qui citent des auteurs japonais, les gènes responsables des cocons de couleur jaune connus sont C- jaune doré, Cd - jaune clair, Ci - jaune profond, dy - jaune dilué, Y - Jaune sang, Ya - jaune mandarine sang, Yc - cocon jaune, Yf - jaune fluorescent et Yr - jaune marron.

Tazima (1964) a signalé que le gène Y est responsable de la couleur jaune du sang et des cocons et est situé sur le deuxième chromosome, locus 25.6. Les gènes I et Is sont connus comme des inhibiteurs du jaune, ils suppriment complètement Y et sont responsables des cocons blancs.

Selon Lea (1993), les gènes responsables des cocons verts sont Ga, Gb et Gc. Comme la race Bonde 517 a des cocons jaune vert, on peut supposer que cette race contient dans son génome les gènes à la fois responsables des cocons jaunes et des cocons verts ou bien il y a un autre gène unique responsable des cocons de couleur jaune vert.

Les résultats que nous avons obtenus dans tous les croisements étudiés suggèrent que la ségrégation phénotypique réelle correspond de manière significative à celle que l'on attendait théoriquement. Les résultats indiquent aussi que si nous croisons des papillons ayant émergé de cocons blancs en F2 et BC, la descendance n'aura aussi que des cocons blancs sans aucune ségrégation.

Comme nous l'avons précisé plus haut, la race Bonde 517 n'est pas homogène par rapport à l'intensité de la couleur du cocon. Les résultats obtenus soulignent que dans les croisements F1 entre Bonde 517 et les lignées Super 1 et Hessa 2 tous les cocons sont jaune vert et sont plus sombres que ceux de la race Bonde 517.

Les groupes de cocons colorés en F2, F3 et F2 de croisements BC sont constitués de cocons ayant différentes nuances jaune vert. Les résultats obtenus permettent de supposer que la population Bonde 517 contient dans son génome plusieurs allèles des gènes responsables de l'intensité différente des pigments jaunes dans les cocons. Il est aussi possible qu'un gène indépendant soit aussi multiallélique. La nouvelle couleur obtenue en F1 pourrait être expliquée par les différentes interactions entre les allèles dominants et l'allèle récessif dans les hétérozygotes comparés aux homozygotes. Nous expliquons l'intensité de couleur différente des cocons en F2 et F3 par les combinaisons entre les différents multiallèles et par les différentes interactions dominant-récessif entre les différents multiallèles dominants et l'allèle récessif. Le crossing-over ayant lieu entre les multiallèles pourrait aussi être impliqué dans ce processus.

Raju et Krishnamurthy (1993) ont signalé après leur expérience de croisement entre la race polyvoltine Pure Mysore aux cocons verts et l'hybride bivoltin NB4D2 × NB7 aux cocons blancs, qu'en F1 tous les cocons étaient verts et qu'en F2 la ségrégation donnait des cocons verts, jaune pale,

blanc cassé et blancs. Différentes nuances de couleur du cocon ont aussi été détectées dans notre expérience.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que le caractère de cocon coloré domine par rapport au caractère de cocon blanc en F1. En F2, la ségrégation obtenue donne 3/4 de cocons colorés et 1/4 de cocons blancs. Dans le BC avec le parent homozygote récessif la ségrégation donne 50 % de cocons colorés et 50 % de cocons blancs.

En F3, F2 de BC et le croisement de BC avec le parent monobivoltin, les ségrégations obtenues comprennent 3 parties de cocons colorés pour une partie de cocons blancs, une partie de cocons colorés pour une partie de cocons blancs, des cocons tous colorés et tous blancs.

Les cocons colorés en F2 et F3 ont des nuances différentes.

D'après les données obtenues, on peut supposer qu'un ou plusieurs gènes responsables de la couleur du cocon sont présents sous forme multiallélique dans la population de Bonde 517, ce qui explique les nuances différentes de couleur du cocon.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour détecter les gènes responsables de la couleur du cocon chez la race polyvoltine.

Les cocons de couleur blanc pur sans aucune nuance peuvent être sélectionnés à des fins de breeding en F2, F3, BC, F2 de BC et le croisement de BC avec le parent monobivoltin sans aucun danger de ségrégation dans les générations suivantes.

EFFECT OF TENDER SHOOT FEEDING ON SILK TECHNOLOGICAL PARAMETERS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

N. MAHESHKUMAR VAGE & J. ASHOKA

Division of Sericulture, NARP-II P.B. 24, Regional Research Station, Raichur 584-101
(Karnataka), India.

*The hybrid, Pure Mysore × NB₄D₂ and its parents, Pure Mysore and NB₄D₂ were reared on tender and matured shoots to know the effect on silk technological parameters of silkworm *Bombyx mori* L. over three different seasons. The fifth instar larvae when fed with tender shoots upto three days followed by matured shoots marked better values for shell weight (2.76 g / 10 shells), shell ratio (23.94 %), silk filament length (755.99 m), silk filament weight (0.19 g) and denier (2.27). The fifth instar silkworm larvae which received tender shoots upto three days performed better during winter followed by summer and rainy season for all the traits studied excepting denier.*

Keywords: Tender shoot feeding, silk technological parameters, fifth instar silkworm larvae, shoot feeding, mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., *B. mori*.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus indica* L.) leaf forms the sole food material for silkworm, *Bombyx mori* L. and the bulk of silk goods produced in the world are from mulberry silk. Nearly 70 % of silk proteins produced by the silkworm is directly derived from proteins of mulberry leaves. The various factors responsible for successful cocoon harvest are mulberry leaf (38.2 %), climate (37.0 %), rearing technique (9.3 %), silkworm breed (4.2 %), silkworm egg (3.1 %) and other factors (6.6 %), (Miyashita, 1986). Thus, mulberry leaf quality plays a dominant role in healthy growth of silkworms and maximisation of cocoon production. The quality of feed is determined by its major components, such as water, carbohydrates, proteins, mineral elements, fats, amino acids and vitamins. It has also been observed that the top tender leaves are nutritionally richer compared to medium matured and matured leaves (Rangaswami *et al.*, 1976). When late age silkworms were fed with tender leaves as against recommended mature leaves, there was a significant increase in shell weight, shell percentage, filament length and total silk content (Krishnaswami *et al.*, 1970). It has also been observed that there was an increase in larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight and shell weight when the fifth instar silkworms were fed with tender leaves upto four days in the beginning of fifth instar (Rajashekargouda and Lakshmikanth, 1998). Further, higher fibroin content in posterior silk gland in *B. mori* was observed in Suvra breed when fed with tender leaves of cultivar S₁, while lower fibroin content was obtained in the Nistari breed fed with mature leaves of cultivar C776 (Qader, 1995). In order to get a good cocoon crop, a common practice being followed by sericulturists of the southern peninsular India (Karnataka as well as Tamil Nadu states) is to feed tender leaves to silkworm during early fifth instar (Rajashekargouda and Lakshmikanth, 1998 and Shivaprakasm *et al.*, 1996). However, the reports on feeding tender shoots to fifth instar silkworms and its effect on crop

performance of fifth instar silkworm are scanty. In this regard the present study was taken up to know the performance of fifth instar silkworm, *Bombyx mori* L., on tender shoots.

MATERIALS AND METHODS

The present investigation was carried out during 1997-1998 over three different rearing periods at the Main Research Station of University of Agricultural Sciences, Dharwad (Karnataka state) which is situated at an altitude of 678 m above mean sea level. The annual mean precipitation recorded was 844.7 mm and fairly well distributed from April to November with two peaks, one in July and another in October. The mean maximum temperature varied from 19.2 °C to 36.31 °C during December and April, whereas the mean minimum temperature varied from 13.66 °C to 21.01 °C during January and May. The relative humidity fluctuated between 57.0 per cent in February and 83.0 per cent in November. The disease free layings (Dfl's) of PM × NB₄D₂, and its parents were procured from Government grainages. The rearing room and equipment were thoroughly disinfected with four per cent formalin solution (Krishnaswami *et al.*, 1973) using Rocker Sprayer (hydraulic high volume sprayer with long hose commonly known as Gator Rocker Sprayer) before the commencement of rearing. The Dfl's of PM × NB₄D₂, NB₄D₂ and Pure Mysore were incubated under ideal conditions. Mass rearing of hybrid PM × NB₄D₂ and its parents was done from brushing till the end of fourth instar on M₅ mulberry variety grown with a spacing of 90 × 90 cm as per recommended package (Krishnaswami, 1978). The larvae were fed four times a day (at 6 am, 11 am, 5 pm and 10 pm) and bed cleaning was done once, twice and thrice during I, II and III instar respectively, daily once in fourth and fifth instar by lifting shoots (Badiger, 1996). On the first day of fifth instar 200 uniform sized healthy worms were selected for each treatment and the same was replicated thrice. The larvae were fed with tender shootlets (30-40 cm below the growing tip) as per the treatment details and for the untreated batch, matured shoots without tender leaves were provided as per recommended package.

Treatment details

- T1 - Tender shoot feeding upto one day and subsequently matured shoots without tender leaves.
- T2 - Tender shoot feeding upto two days and subsequently matured shoots without tender leaves.
- T3 - Tender shoot feeding upto three days and subsequently matured shoots without tender leaves.
- T4 - Tender shoot feeding upto four days and subsequently matured shoots without tender leaves.
- T5 - Tender shoot feeding upto five days and subsequently matured shoots without tender leaves.
- T6 - Tender shoot feeding for entire fifth instar.
- T7 - Feeding matured shoots without tender leaves (control).

Spacing of worms, mounting of spinning larvae, harvesting of cocoons, were carried out as described by Krishnaswami *et al.*, 1973.

The data were recorded on parameters such as shell weight, shell ratio, silk filament length, silk filament weight and denier. The data collected for the present study on different seasons were analysed statistically by adopting factorial randomised design as suggested by Gomez and Gomez (1984).

RESULTS

The results on the effect of feeding tender shoots to fifth instar silkworm larvae are presented below.

Shell weight (g) - Table I:

Significant differences were noticed in respect of shell weight in all the breeds during all the seasons. Larvae fed with tender shoots recorded a maximum shell weight in T3 (2.76 g), followed by

T2 (2.48 g), T1 (2.30 g), T7 (2.22 g), T4 (2.18 g), T5 (1.85 g) and T6 (1.75 g) and all the treatments differed significantly with each other. Among seasons, the significantly highest shell weight (2.54 g) was recorded during winter followed by summer (2.23 g) and rainy (1.89 g) seasons. However, shell weight varied with breeds, NB₄D₂ recorded the significantly highest shell weight (2.72 g) followed by PM × NB₄D₂ (2.55 g) and PM (1.38 g), all breeds differed significantly with each other. The interaction between treatments and seasons was significant. The highest shell weight was recorded in T3 (3.06 g) during winter, which was significantly superior over the rest of the treatments and seasons combinations. The interaction between treatments and breeds was significant. Maximum shell weight was recorded in NB₄D₂ (3.29 g) and PM × NB₄D₂ (3.24 g) in T3 which were significantly superior over other treatment × breed combinations. There was a significant difference due to seasons and breeds interaction. The significantly highest shell weight was recorded during winter (3.15 g) in NB₄D₂ which was significantly superior over other combinations. The overall interaction of treatments, seasons and breeds was also significant. Maximum shell weight was recorded in T3 (3.74 g) during winter season in NB₄D₂ which was significantly superior over other combinations.

Shell ratio (%) - Table II:

The influence of tender shoot feeding was significantly different in all the breeds and seasons with respect to shell percentage. The shell ratio was significantly the highest in T3 (16.41 %) followed by T2 (15.63 %), T1 (15.25 %), T7 (14.97 %), T4 (14.73 %), T5 (13.54 %) and T6 (13.16 %) and all the treatments differed significantly with each other except T4 and T7 which were on par. Among seasons, significantly the highest shell ratio (15.62 %) was recorded during winter followed by summer (14.91 %) and rainy (13.90 %) seasons. Further, the shell ratio varied with breeds and NB₄D₂ recorded significantly the highest shell ratio (16.13 %) followed by PM × NB₄D₂ (15.88 %) and PM (12.43 %). The interaction between treatments and seasons was non-significant. However, significant differences were noticed in treatments and breeds interaction and maximum shell ratio was recorded in PM × NB₄D₂ (17.90 %) and NB₄D₂ (17.55 %) in T3 which were significantly superior over treatments and breeds combinations. There was a significant difference due to seasons and breeds interaction and significantly the highest shell ratio was recorded during the winter season (17.26%) in NB₄D₂ which was significantly superior over other combinations. The overall interaction of treatments, seasons and breeds was also significant. Maximum shell ratio was recorded in T3 during winter in NB₄D₂ (18.26 %) which was similar to T2 of NB₄D₂ and its hybrid, T7 of NB₄D₂ and its hybrid during winter (17.63 to 17.79 %) and T3 of PM × NB₄D₂ (17.63 to 18.12 %) during all the seasons studied.

Silk filament length (m) Table III:

The effect of tender shoot feeding was significant in all the breeds and seasons studied. Significantly the longest filament length was recorded in T3 (755.99 m) which was significantly superior over T2 (733.10 m), T1 (715.79 m), T7 (705.66 m), T4 (682.99), T5 (653.07 m) and T6 (640.00 m) and all the treatments differed significantly with each other. Among different seasons, the significantly higher filament length was recorded during winter (718.59 m), followed by summer (700.88 m) and rainy (674.77 m) seasons. However, the filament length varied with breeds, significantly longer filament was recorded in NB₄D₂ (1012.69 m) which was significantly superior over PM × NB₄D₂ (681.08 m) and PM (400.47 m). The interaction between treatment and season was significant. Maximum filament length was recorded in T3 (771.87 m) during winter which was significantly superior over treatments and seasons combinations. A significant interaction between treatments and breeds was noticed. The highest filament length was recorded in T3 (1,101.91 m) in NB₄D₂ which was significantly superior over the rest of the combinations. The interaction between seasons and breeds revealed significant differences. During winter, the maximum filament length was noticed in NB₄D₂ (1,044.49 m) which was significantly superior over rest of the seasons and breeds combinations.

Table 1. Effect of tender shoot feeding on shell weight (g/10 shells) for Pure Mysore, NB₄D₂ and PM × NB₄D₂ over seasons.
Tableau 1. Effet de l'alimentation avec des pousses tendres sur le poids de la coque (g/10 coques) chez Pure Mysore, NB₄D₂ et PM × NB₄D₂ pendant les saisons.

Treatments	Winter (S ₁)			Summer (S ₂)			Rainy (S ₃)			Treatment Mean	Treatment × Season			Treatment × Breed		
Traitements	Hiver (S ₁)			Eté (S ₂)			Saison des pluies (S ₃)				Traitement × Saison			Traitement × Lignée		
	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	Moyenne des traitements	Winter Hiver (S ₁)	Summer Eté (S ₂)	Rainy Pluies (S ₃)	PM (B ₁)	NB ₄ D ₂ (B ₂)	PM × NB ₄ D ₂ (B ₃)
Tender shoot feeding upto one day (T1) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 1 jour (T1)	1.68	3.27	3.01	1.42	2.83	2.66	1.21	2.58	2.06	2.30 ^e	2.65	2.30	1.95	1.44	2.89	2.57
Tender shoot feeding upto two days (T2) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 2 jours (T2)	1.85	3.55	3.22	1.59	2.91	2.82	1.39	2.59	2.38	2.48 ^b	2.87	2.44	2.12	1.61	3.02	2.80
Tender shoot feeding upto three days (T3) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 3 jours (T3)	1.97	3.74	3.49	1.70	3.16	3.21	1.56	2.97	3.01	2.76 ^a	3.06	2.69	2.51	1.74	3.29	3.24
Tender shoot feeding upto four days (T4) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 4 jours (T4)	1.48	2.93	2.95	1.31	2.52	3.00	1.09	2.15	2.18	2.18 ^e	2.45	2.28	1.81	1.29	2.53	2.71
Tender shoot feeding upto five days (T5) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 5 jours (T5)	1.36	2.67	2.26	1.20	2.27	2.15	1.00	1.95	1.75	1.85 ^f	2.10	1.88	1.57	1.19	2.30	2.05
Tender shoot feeding for entire 5th instar (T6) / Alimentation avec des pousses tendres pendant tout le 5ème âge (T6)	1.29	2.64	2.22	1.18	2.22	2.03	1.00	1.76	1.45	1.75 ^g	2.05	1.81	1.40	1.16	2.21	1.90
Mature shoot feeding without tender leaves (control) (T7) / Alimentation avec des pousses adultes sans feuilles tendres (témoin) (T7)	1.42	3.28	3.00	1.26	2.65	2.69	1.20	2.43	2.04	2.22 ^d	2.56	2.20	1.89	1.29	2.78	2.57
Season × Breed / Saison × lignée	1.58	3.15	2.88	1.38	2.65	2.65	1.21	2.35	2.12	2.22	2.54 ^a	2.23 ^b	1.89 ^c	1.38 ^c	2.72 ^a	2.55 ^b
Comparing the means of Comparaison des moyennes de S.E.m±	Treatments (T) Traitements (T)			Season (S) Saison (S)			Breeds (B) Lignées (B)			T × S	T × B			S × B		
	0.0142			0.0093			0.0093			0.0246	0.0246			0.0161		
C.D. at 0.05 / D.C. à 0,05	0.039			0.026			0.026			0.068	0.068			0.045		

Means followed by the same letter in a column and row do not differ significantly (P= 0.05) by DMRT / Les moyennes suivies par la même lettre dans une colonne et dans une ligne ne diffèrent pas de manière significative (P = 0,05) d'après DMRT.

Table II. Effect of tender shoot feeding on shell ratio (%) for Pure Mysore, NB₄D₂ and PM × NB₄D₂ over seasons.**Tableau II. Effet de l'alimentation avec des pousses tendres sur la richesse soyeuse (%) chez Pure Mysore, NB₄D₂ et PM × NB₄D₂ pendant les saisons.**

Treatments	Winter (S ₁)			Summer (S ₂)			Rainy (S ₃)			Treatment Mean	Treatment × Season			Treatment × Breed		
Traitements	Hiver (S ₁)			Été (S ₂)			Saison des pluies (S ₃)				Traitement × Saison			Traitement × Lignée		
	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	Moyenne des traitements	Winter Hiver (S ₁)	Summer Été (S ₂)	Rainy Pluies (S ₃)	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂
	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)					(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)
Tender shoot feeding upto one day (T1) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 1 jour (T1)	13.48	17.38	17.51	12.56	16.95	16.99	11.96	16.28	14.06	15.25 ^c	16.12	15.50	14.10	12.66	16.87	16.18
Tender shoot feeding upto two days (T2) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 2 jours (T2)	14.14	17.79	17.69	13.21	16.91	17.19	12.13	16.42	15.27	15.63 ^b	16.54	15.77	14.60	13.16	17.04	16.71
Tender shoot feeding upto three days (T3) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 3 jours (T3)	14.73	18.26	18.12	13.65	17.22	17.96	12.99	17.17	17.63	16.41 ^a	17.03	16.27	15.93	13.79	17.55	17.90
Tender shoot feeding upto four days (T4) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 4 jours (T4)	11.87	17.13	17.86	11.85	15.34	16.77	11.77	14.09	15.97	14.73 ^d	15.62	14.65	13.94	11.83	15.52	16.86
Tender shoot feeding upto five days (T5) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 5 jours (T5)	11.99	16.35	14.21	11.65	14.82	14.52	11.69	13.03	13.64	13.54 ^c	14.18	13.66	12.78	11.77	14.73	14.12
Tender shoot feeding for entire fifth instar (T6) / Alimentation avec des pousses tendres pendant tout le 5 ^{ème} âge (T6)	11.81	16.33	13.97	11.74	14.73	13.91	11.75	12.69	11.57	13.16 ^f	14.03	13.46	12.00	11.76	14.58	13.15
Mature shoot feeding without tender leaves (control) (T7) / Alimentation avec des pousses adultes sans feuilles tendres (témoin) (T7)	12.19	17.63	17.76	12.05	16.28	16.95	11.91	16.00	14.01	14.97 ^d	15.86	15.09	13.97	12.05	16.63	16.24
Season × Breed / Saison × lignée	12.88	17.26	16.73	12.38	16.03	16.32	12.03	15.09	14.59	14.81	15.62 ^a	14.91 ^b	13.90 ^c	12.43 ^e	16.13 ^d	15.88 ^b
Comparing the means of Comparaison des moyennes de S.E.m±	Treatments (T) Traitements (T)			Season (S) Saison (S)			Breeds (B) Lignées (B)			T × S	T × B			S × B		
	0.102			0.067			0.067			0.177	0.177			0.116		
C.D. at 0.05 / D.C. à 0.05	0.285			0.187			0.187			NS	0.494			0.324		

Means followed by the same letter in a column and row do not differ significantly ($P=0.05$) by DMRT / Les moyennes suivies par la même lettre dans une colonne et dans une ligne ne diffèrent pas de manière significative ($P=0.05$) d'après DMRT. NS : Non significant / Non significatif.

Table III. Effect of tender shoot feeding on silk filament length (m) for Pure Mysore, NB₄D₂ and PM × NB₄D₂ over seasons.

Tableau III. Effet de l'alimentation avec des pousses tendres sur la longueur du filament (m) chez Pure Mysore, NB₄D₂ et PM × NB₄D₂ pendant les saisons.

Treatments	Winter (S ₁)			Summer (S ₂)			Rainy (S ₃)			Treatment Mean	Treatment × Season			Treatment × Breed				
Traitements	Hiver (S ₁)			Été (S ₂)			Saison des pluies (S ₃)				Traitement × Saison			Traitement × Lignée				
	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	Moyenne des Traitements	Winter Hiver (S ₁)	Summer Été (S ₂)	Rainy Pluies (S ₃)	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂		
	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)					(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)		
Tender shoot feeding upto one day (T1) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 1 jour (T1)	422.18	1070.12	715.28	409.16	1030.23	704.60	398.12	1000.27	692.13	715.79 ^c	735.86	714.66	696.84	409.82	1033.54	704.00		
Tender shoot feeding upto two days (T2) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 2 jours (T2)	432.25	1095.20	725.27	420.20	1080.96	715.50	408.18	1020.15	700.17	733.10 ^b	750.91	738.89	709.50	420.21	1065.44	713.65		
Tender shoot feeding upto three days (T3) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 3 jours (T3)	445.23	1125.22	745.17	435.18	1105.27	735.23	417.15	1075.23	720.21	755.99 ^a	771.87	758.56	737.53	432.52	1101.91	733.54		
Tender shoot feeding upto four days (T4) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 4 jours (T4)	412.21	1025.20	685.16	400.23	995.25	674.18	384.25	930.22	640.20	682.99 ^c	707.53	689.89	651.56	398.90	983.56	666.52		
Tender shoot feeding upto five days (T5) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 5 jours (T5)	400.23	975.25	650.22	372.96	962.28	634.82	356.32	905.31	620.21	653.07 ^f	675.23	656.69	627.28	376.50	947.62	635.08		
Tender shoot feeding for entire fifth instar (T6) / Alimentation avec des pousses tendres pendant tout le 5 ^{ème} âge (T6)	384.18	960.28	640.23	360.24	944.31	625.16	346.18	897.17	602.22	640.00 ^h	661.57	643.24	615.19	363.53	933.92	622.54		
Mature shoot feeding without tender leaves (control) (T7) / Alimentation avec des pousses adultes sans feuilles tendres (témoin) (T7)	416.17	1060.15	705.27	399.18	1018.27	695.23	390.14	990.22	676.18	705.65 ^d	727.20	704.23	685.51	401.83	1022.88	692.23		
Season × Breed / S×L	416.07	1044.49	695.23	399.59	1019.51	683.53	385.76	974.08	664.48	698.08	718.59 ^a	700.88 ^b	674.77 ^c	400.47 ^c	1012.69 ^a	681.08 ^b		
Comparing the means of Treatments (T)	Season (S)			Breeds (B)			T × S			T × B			S × B			T×S×B		
Comparaison des moyennes de Traitements (T)	Saison (S)			Lignées (B)														
S.E.m±	0.0926			0.0606			0.1604			0.1604			0.1050			0.2777		
C.D. at 0.05 / D.C. à 0,05	0.259			0.169			0.449			0.449			0.294			0.778		

Means followed by the same letter in a column and row do not differ significantly (P= 0.05) by DMRT / Les moyennes suivies par la même lettre dans une colonne et dans une ligne ne diffèrent pas de manière significative (P = 0,05) d'après DMRT. S × L : - Saison × Lignée.

Table IV. Effect of tender shoot feeding on silk filament weight (g) for Pure Mysore, NB₄D₂ and PM × NB₄D₂ over seasons.Tableau IV. Effet de l'alimentation avec des pousses tendres sur le poids du filament (g) chez Pure Mysore, NB₄D₂ et PM × NB₄D₂ pendant les saisons.

Treatments	Winter (S ₁)			Summer (S ₂)			Rainy (S ₃)			Treatment Mean	Treatment × Season			Treatment × Breed		
Traitements	Hiver (S ₁)			Eté (S ₂)			Saison des pluies (S ₃)				Traitement × Saison			Traitement × Lignée		
	PM (B ₁)	NB ₄ D ₂ (B ₂)	PM × NB ₄ D ₂ (B ₃)	PM (B ₁)	NB ₄ D ₂ (B ₂)	PM × NB ₄ D ₂ (B ₃)	PM (B ₁)	NB ₄ D ₂ (B ₂)	PM × NB ₄ D ₂ (B ₃)	Moyenne des Traitements	Winter Hiver (S ₁)	Summer Eté (S ₂)	Rainy Pluies (S ₃)	PM (B ₁)	NB ₄ D ₂ (B ₂)	PM × NB ₄ D ₂ (B ₃)
Tender shoot feeding upto one day (T1) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 1 jour (T1)	0.11	0.26	0.18	0.10	0.26	0.18	0.10	0.25	0.18	0.18 ^b	0.18	0.18	0.18	0.11	0.26	0.18
Tender shoot feeding upto two days (T2) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 2 jours (T2)	0.11	0.27	0.18	0.11	0.27	0.18	0.11	0.26	0.18	0.19 ^a	0.19	0.19	0.18	0.11	0.27	0.18
Tender shoot feeding upto three days (T3) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 3 jours (T3)	0.11	0.27	0.19	0.11	0.26	0.19	0.11	0.27	0.18	0.19 ^a	0.19	0.19	0.19	0.11	0.27	0.19
Tender shoot feeding upto four days (T4) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 4 jours (T4)	0.11	0.26	0.17	0.10	0.24	0.17	0.10	0.24	0.17	0.17 ^c	0.18	0.18	0.17	0.10	0.25	0.17
Tender shoot feeding upto five days (T5) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 5 jours (T5)	0.10	0.24	0.17	0.10	0.24	0.16	0.09	0.23	0.16	0.17 ^c	0.17	0.17	0.16	0.10	0.24	0.16
Tender shoot feeding for entire fifth instar (T6) / Alimentation avec des pousses tendres pendant tout le 5ème âge (T6)	0.10	0.24	0.16	0.10	0.24	0.16	0.09	0.23	0.16	0.16 ^d	0.17	0.17	0.17	0.10	0.24	0.16
Mature shoot feeding without tender leaves (control) (T7) / Alimentation avec des pousses adultes sans feuilles tendres (témoin) (T7)	0.11	0.26	0.18	0.10	0.25	0.18	0.10	0.25	0.18	0.18 ^b	0.18	0.18	0.17	0.11	0.26	0.18
Season × Breed / Saison × lignée	0.11	0.26	0.18	0.10	0.25	0.17	0.10	0.25	0.17	0.18	0.18 ^a	0.18 ^a	0.17 ^b	0.10 ^c	0.25 ^a	0.17 ^b
Comparing the means of Comparaison des moyennes de S.E.m± C.D. at 0.05 / D.C. à 0,05	Treatments (T) Traitements (T) 0.0001 0.0002			Season (S) Saison (S) 0.0001 0.0002			Breeds (B) Lignées (B) 0.0001 0.0002			T × S 0.0001 0.0002	T × B 0.0001 0.0003			S × B 0.0001 0.0003		
	T × S × B 0.0002 0.0005															

Means followed by the same letter in a column and row do not differ significantly (P= 0.05) by DMRT / Les moyennes suivies par la même lettre dans une colonne et dans une ligne ne diffèrent pas de manière significative (P = 0.05) d'après DMRT.

Table V. Effect of tender shoot feeding on denier for Pure Mysore, NB₄D₂ and PM × NB₄D₂ over seasons.Tableau V. Effet de l'alimentation avec des pousses tendres sur le titre chez Pure Mysore, NB₄D₂ et PM × NB₄D₂ pendant les saisons.

Treatments	Winter (S ₁)			Summer (S ₂)			Rainy (S ₃)			Treatment Mean	Treatment × Season			Treatment × Breed		
Traitements	Hiver (S ₁)			Été (S ₂)			Saison des pluies (S ₃)			Moyenne des traitements	Traitement × Saison			Traitement × Lignée		
	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂		Winter Hiver	Summer Été	Rainy Pluies	PM	NB ₄ D ₂	PM × NB ₄ D ₂
	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)		(S ₁)	(S ₂)	(S ₃)	(B ₁)	(B ₂)	(B ₃)
Tender shoot feeding upto one day (T ₁) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 1 jour (T ₁)	2.33	2.22	2.27	2.35	2.24	2.30	2.37	2.26	2.32	2.30 ^d	2.28	2.30	2.32	2.35	2.24	2.30
Tender shoot feeding upto two days (T ₂) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 2 jours (T ₂)	2.33	2.21	2.27	2.35	2.23	2.29	2.36	2.26	2.32	2.29 ^a	2.27	2.29	2.31	2.35	2.24	2.29
Tender shoot feeding upto three days (T ₃) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 3 jours (T ₃)	2.32	2.20	2.25	2.33	2.22	2.27	2.35	2.25	2.29	2.27 ^f	2.26	2.27	2.29	2.33	2.22	2.27
Tender shoot feeding upto four days (T ₄) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 4 jours (T ₄)	2.35	2.24	2.29	2.36	2.25	2.31	2.36	2.28	2.34	2.31 ^c	2.29	2.31	2.33	2.36	2.26	2.31
Tender shoot feeding upto five days (T ₅) / Alimentation avec des pousses tendres pendant 5 jours (T ₅)	2.36	2.26	2.32	2.39	2.26	2.33	2.37	2.29	2.36	2.33 ^b	2.31	2.33	2.34	2.37	2.27	2.33
Tender shoot feeding for entire fifth instar (T ₆) / Alimentation avec des pousses tendres pendant tout le 5 ^{ème} âge (T ₆)	2.39	2.26	2.31	2.40	2.26	2.34	2.39	2.29	2.39	2.34 ^a	2.32	2.33	2.36	2.39	2.27	2.35
Mature shoot feeding without tender leaves (control) (T ₇) / Alimentation avec des pousses adultes sans feuilles tendres (témoin) (T ₇)	2.35	2.24	2.28	2.37	2.25	2.30	2.37	2.27	2.33	2.31 ^c	2.29	2.31	2.32	2.36	2.25	2.30
Season × Breed / Saison × lignée	2.35	2.23	2.28	2.36	2.24	2.31	2.37	2.27	2.34	2.31	2.29 ^c	2.30 ^b	2.32 ^a	2.36 ^a	2.25 ^c	2.31 ^b
Comparing the means of Comparaison des moyennes de S.E.m±	Treatments (T) Traitements (T)			Season (S) Saison (S)			Breeds (B) Lignées (B)			T × S	T × B			S × B		
	0.001			0.0006			0.0006			0.0017	0.0017			0.0011		
C.D. at 0.05 / D.C. à 0,05	0.003			0.002			0.002			0.004	0.004			0.003		

Means followed by the same letter in a column and row do not differ significantly ($P=0.05$) by DMRT / Les moyennes suivies par la même lettre dans une colonne et dans une ligne ne diffèrent pas de manière significative ($P=0.05$) d'après DMRT.

The overall interaction of treatments, seasons and breeds revealed significant differences. The highest filament length was recorded in T3 (1,125.22 m) during the winter season in NB₄D₂ which was significantly superior over other combinations.

Silk filament weight (g) Table IV:

The influence of tender shoot feeding was significant in all the breeds and seasons tested. The larvae fed with tender shoots registered the highest silk filament weight in T2 and T3 (0.19 g) followed by T1 and T7 (0.18 g), T4 and T5 (0.17 g). Significantly the lowest silk filament weight was noticed in T6 (0.16 g). Among different seasons, the maximum filament weight was recorded during winter and summer (0.18 g), which were significantly superior over rainy (0.17 g) season. Among different breeds, the significantly highest filament weight was obtained in NB₄D₂ (0.25 g) followed by PM × NB₄D₂ (0.17 g) and PM (0.10 g). The interaction between treatments and seasons revealed significant differences. The maximum filament weight was recorded in T3 (0.19 g) in all the seasons and T2 (0.19 g) during winter and summer, which were significantly superior over other combinations. The interaction between treatments and breeds was significant. The significantly highest filament weight was recorded in T2 and T3 (0.27 g) of NB₄D₂ which were superior over other combinations. Significant differences were observed in season and breed interaction. Maximum filament weight was recorded during winter in NB₄D₂ (0.26 g) which was significantly superior over other combinations. The overall interaction of treatments, seasons and breeds was significant. Maximum filament weight was recorded in T2 during winter and summer and T3 during winter and rainy seasons in NB₄D₂ (0.27 g) which were significantly superior over other combinations.

Denier - Table V:

The effect of tender shoot feeding tested on larvae produced significant differences in all the breeds and seasons. The lowest denier was recorded in T3 (2.27) which was significantly different from T2 (2.29), T1 (2.30), T4 and T7 (2.31), T5 (2.33) and T6 (2.34) and all the treatments differed significantly with each other except T4 and T7 which were on par. Among seasons, the lowest denier was recorded during winter (2.29) followed by summer (2.30) and rainy (2.32) seasons. Further, the denier varied with breeds and NB₄D₂ recorded the lowest denier (2.25) followed by PM × NB₄D₂ (2.31) and PM (2.36). The interaction between treatments and seasons was significant and the lowest denier was recorded in T3 (2.26) during winter, which was significantly superior over the rest of the treatment and season combinations. The interaction between treatments and breeds was significant and the significantly lowest denier was recorded in T3 (2.22) in NB₄D₂ which was significantly different from other treatment and breed combinations. There was significant difference due to season and breed interaction and significantly the lowest denier was recorded during winter (2.23) in NB₄D₂, which was significantly different from other combinations. The overall interaction of treatments, seasons and breeds was also significant. The lowest denier was recorded in T3 (2.20) in NB₄D₂ during winter, which was significantly different from other combinations.

DISCUSSION

Tender shoot feeding to fifth instar silkworm upto third day and subsequently with matured shoots (T3) registered an increase in shell weight, shell ratio, silk filament length, silk filament weight and denier. The shell weight was maximum with cocoons obtained from the larvae fed with tender shoots upto three days T3 (2.76 g) and the lowest shell weight was recorded in T6 (1.75 g). The highest shell weight was recorded during winter. These results are in agreement with Krishnaswami *et al.* (1970); Narayanan *et al.* (1967); Anonymous (1980). Further, comparatively the lower cocoon weight obtained in T7 (2.22) might be due to matured shoot feeding, this finding is in full agreement with the studies of Jadhav (1989) who reported that feeding matured leaves reduced the cocoon weight, pupal weight and shell weight. Qader *et al.* (1992) observed that feeding tender leaves increased the

shell weight and feeding coarse leaves showed poor performance in respect of cocoon characters. The lower shell weight observed in T6 is supported by Bergold (1963) and Shivaprakasam *et al.* (1996) according to them there was an increased acidity of body fluids and virus multiplication which resulted in disease spread at higher rate. This might have resulted in poor cocoon construction which ultimately had less shell weight. Significantly higher shell ratio resulted in T3 (16.41 %) while the lowest was in T6 (13.16 %). Shell ratio was higher during winter. The present findings are in corroboration with the findings of Singh *et al.* (1994) who reported higher shell ratio in respect of bivoltine breed NB4D2. Rajashekhargouda and Lakshmikanth (1998) also found that the feeding of tender leaves increased the shell ratio from 14.99 to 16.19 per cent in PM × NB4D2 when compared with recommended package of practices and is more or less in line with the present findings. In the present studies, the highest silk filament length 755.99 m and weight (0.19 g) was recorded in T3. Lowest silk filament length (640.00 m) and weight (0.16 g) was noticed in T6. The fifth instar larvae supplemented with tender shoots upto three days might have accumulated higher fibroin content which might have resulted in higher filament length and weight in T3 which is more or less similar to the observation of Qader (1995) who reported that fibroin content in the posterior silk gland of *Bombyx mori* L. increased when silkworms were fed with tender leaves. Further, the current trend of results is more or less in line with the findings of Hanif and Islam (1987) who found the highest weight and length of silk thread when larvae of *B. mori* were reared on first to fourth order leaves. Furthermore, Rajashekhargouda and Lakshmikanth (1998) also confirmed that feeding tender leaves to V instar silkworms resulted in increased silk filament length and weight when compared to normal feeding (recommended package of practices). During winter, the lowest denier was recorded in the cocoons obtained from the larvae fed with tender shoots upto three days and subsequently mature shoots without tender leaves T3 (2.27) while in T6, the denier was highest (2.34). The present trend of results are in conformity with the reports of Rajashekhargouda and Lakshmikanth (1998) who observed that feeding tender leaves to fifth instar silkworms recorded lowest denier when compared with recommended package of practices.

It is concluded that feeding tender shoots to fifth instar silkworms upto third day and subsequently with matured shoots favoured the silk technological parameters studied.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1980) Text book of tropical sericulture, 2nd Edition, Japan Overseas Co-operation Volunteers, Tokyo, p. 618.
- BADIGER K.S. (1996) Performance of improved mulberry varieties for shoot feeding in traditional tract of North Karnataka. M. Sc. (Agri.) Thesis, University of Agricultural Sciences, Dharwad, p.127.
- BERGOLD G.H. (1963) The nature of NPV In: Insect Pathology-an Advanced Treatise (E.A. Steinhaus, Ed.). Academic Press, New York, Vol. 1: 443-456.
- GOMEZ K.A. & GOMEZ A.A. (1984) Statistical procedures for agricultural research, 2nd Edition John Wiley and sons, New York., p 627.
- * HANIF M. A. & ISLAM B.N. (1987) Nutrient contents of mulberry leaves and their effect on silk production by *Bombyx mori* L. Bangladesh Journal of Zoology, 15: 131-136.
- JADHAV G.K. & KALLAPUR V.L. (1989) Contribution of tissue proteins to the cocoon shell in the fifth instar silkworm *Bombyx mori* L., Entomon, 14 (1&2): 21-24.
- KRISHNASWAMI S. (1978) Mulberry cultivation in South India. Bulletin No. 1, Central Sericultural Research and Training Institute, Central Silk Board, Mysore, p. 19.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYAN S.K. & KUMARA RAJ S. (1973) Manual on sericulture, 2 Silkworm Rearing, FAO - Rome, p. 131.
- KRISHNASWAMI S., NOAMANI M.K.R. & AHASAN M. (1970) Studies on the quality of mulberry leaves and silkworm cocoon crop production. Indian Journal of Sericulture, 9:1-10.

- MIYASHITA Y. (1986) A report on mulberry cultivation and training methods suitable to bivoltine rearing in Karnataka, pp. 1-7.
- NARAYANAN E.S., KASIVISWANATHAN K. & SITARAMA IYENGER M.N. (1967) Preliminary observation on the effect of feeding leaves of varying maturity on the larval development and cocoon characters of *Bombyx mori* L. Indian Journal of Sericulture, 6(2): 109-113.
- * QADER M.A., (1995) Effects of mulberry leaf quality on fibroin content in the posterior silk gland of *Bombyx mori* L. Bangladesh Journal of Zoology, 23(2): 229-232.
- *QADER M.A., HAQUE R. & ABSAR N. (1992) Nutritive effects of different types of mulberry leaves on larval growth and cocoon characters of *Bombyx mori* L. Pakistan Journal of Zoology, 24: 341-345.
- RAJASHEKHARGOUDA, R. PATIL & LAKSHMIKANTH R. (1998) Effect of feeding tender leaf on economic traits of *Bombyx mori* L. Paper presented at the Third National Seminar on Prospects and Problems of Sericulture in India, 16-18 March, Vellore, Tamil Nadu, Abstract, pp. 16-17.
- RANGASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R. & JOLLY M.S. (1976) Sericulture Manual-I Mulberry Cultivation. FAO Agricultural Services, Bulletin, 15/1, Rome, p. 150.
- SHIVAPRAKASAM N., JAYARANI S., RABINDRA R.J. (1996) Influence of certain physical factors on the grasserie disease of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian Journal of Sericulture, 35(1): 69-70.
- SINGH K.K., INGALHALLI S.S., SAVANURMATH C.J., SANAKAL R.D. & HICHIGERI S.B. (1994) Effect of feeding different stages of mulberry leaves on growth and economic parameters of *Bombyx mori* L. during nuclear polyhedrosis. Proceedings of Second National Seminar on Problems and Prospects of Sericulture, March 7-9, Vellore, Tamil Nadu, pp. 113-124.
- * Original not found.

EFFET DE L'ALIMENTATION DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. AVEC DES POUSSSES TENDRES SUR LES PARAMETRES TECHNOLOGIQUES DE LA SOIE

N. MAHESHKUMAR VAGE & J. ASHOKA

Division of Sericulture, NARP-II, P.B. 24, Regional Research Station, Raichur 584-101 (Karnataka), Inde.

*Nous avons élevé l'hybride Pure Mysore × NB4D2 et ses parents, Pure Mysore et NB4D2 avec des pousses tendres et matures pendant trois saisons différentes pour connaître l'effet sur les paramètres technologiques de la soie du ver à soie **Bombyx mori** L. Les larves de cinquième âge obtiennent de meilleures valeurs pour le poids de la coque (2,76 g / 10 coques), pour la richesse soyeuse (23,94 %), pour la longueur du filament de soie (755,99 m), pour le poids du filament de soie (0,19 g) et le titre (2,27) quand elles sont nourries avec des pousses tendres pendant trois jours, puis avec des pousses matures. Les larves de ver à soie de cinquième âge qui reçoivent des pousses tendres pendant trois jours ont de meilleures performances pour tous les traits étudiés sauf le titre pendant l'hiver, puis pendant l'été et pendant la saison des pluies.*

INTRODUCTION

La feuille de mûrier (*Morus indica* L.) constitue la seule source de nourriture du ver à soie *Bombyx mori* L. et la plus grande partie des produits en soie dans le monde sont en soie mûrier. Près de 70 % des protéines de soie produites par le ver à soie dérivent directement des protéines des feuilles de mûrier. Les divers facteurs favorisant une bonne récolte de cocons sont la feuille de mûrier (38,2 %), le climat (37 %), la technique d'élevage (9,3 %), la lignée de vers à soie (4,2 %), les oeufs de vers à soie (3,1 %) et d'autres facteurs (6,6 %) (Miyashita, 1986). Ainsi, la qualité de la feuille de mûrier joue un rôle dominant pour la croissance et la bonne santé des vers à soie et la production de cocons. La qualité de la nourriture est déterminée par ses composants principaux tels que l'eau, les hydrates de carbone, les protéines, les éléments minéraux, les graisses, les acides aminés et les vitamines. On a aussi observé que les feuilles tendres du haut sont plus riches nutritionnellement par rapport aux feuilles moyennement matures et matures (Rangaswami et coll., 1976). Quand les vers à soie du dernier âge sont nourris avec des feuilles tendres plutôt qu'avec des feuilles matures comme cela est recommandé, il y a une augmentation significative du poids de la coque, de la richesse soyeuse, de la longueur du filament et de la teneur totale en soie (Krishnaswami et coll., 1970). Il a aussi été observé qu'il se produit une augmentation du poids larvaire, du taux effectif d'élevage, du poids du cocon et du poids de la coque quand les vers à soie du cinquième âge sont nourris avec des feuilles tendres pendant quatre jours au début du cinquième âge (Rajashekargouda et Lakshmikanth, 1998). De plus, on a observé une teneur plus élevée en fibroïne dans la glande séricigène de *B. mori* avec la lignée Suvra quand ils sont nourris avec des feuilles tendres du cultivar S1, tandis qu'on obtient une teneur en fibroïne plus faible chez la lignée Nistari nourrie avec des feuilles matures du cultivar C776 (Qader, 1995). Pour obtenir une bonne récolte de cocons, une pratique courante suivie par les sériciculteurs dans la péninsule du sud de l'Inde (dans les états du Karnataka tout comme dans ceux du Tamil Nadu) consiste à donner des feuilles tendres aux vers à soie au début du cinquième âge

(Rajashekargouda et Lakshmikanth, 1998 et Shivaprakasm et coll., 1996). Cependant, les études sur l'alimentation des vers à soie du cinquième âge avec des pousses tendres et son effet sur la performance de récolte sont peu nombreuses. Cette étude a été entreprise pour connaître la performance du ver à soie *Bombyx mori* L. du cinquième âge nourri avec des pousses tendres.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée en 1997-1998 pendant trois périodes d'élevage différentes à la Station de Recherche Principale de l'Université des Sciences Agricoles, de Dharwad (état de Karnataka) qui est située à une altitude de 678 m au-dessus du niveau de la mer. La moyenne annuelle des précipitations est de 844,7 mm, assez bien distribuées d'avril à novembre avec deux pics l'un en juillet et l'autre en octobre. La température moyenne maximum varie de 19,2° C à 36,31° C en décembre et avril, tandis que la température moyenne minimum est comprise entre 13,66° C et 21,01° C en janvier et en mai. L'humidité relative fluctue entre 57 pour-cent en février et 83 % en novembre. Les pontes saines (DFL) de PM × NB₄D₂ et de ses parents sont obtenues auprès de centres de grainage gouvernementaux. La salle d'élevage et le matériel sont soigneusement désinfectés avec une solution de formol à quatre pour-cent (Krishnaswami et coll., 1973) en utilisant un vaporisateur Rocker (vaporisateur hydraulique à volume élevé avec un long tuyau connu couramment sous le nom de Gator Rocker Sprayer) avant le début de l'élevage en masse. Les pontes saines de PM × NB₄D₂, de NB₄D₂ et de Pure Mysore sont incubées dans des conditions idéales. On procède à l'élevage en masse de l'hybride PM × NB₄D₂ et de ses parents, de la levée jusqu'à la fin du quatrième âge avec la variété de mûrier M5, cultivée avec un espacement de 90 × 90 cm d'après les recommandations (Krishnaswami, 1978). Les larves sont nourries quatre fois par jour (à 6 heures, 11 heures, 17 heures et 22 heures) et la litière est nettoyée une fois, deux fois et trois fois respectivement pendant le premier, deuxième et troisième âge, et une fois par jour pendant le quatrième et le cinquième âge en soulevant les pousses (Badiger, 1996). Le premier jour du cinquième âge, 200 vers en bonne santé de taille uniforme sont sélectionnés pour chaque traitement, qui est répété trois fois. Les larves sont nourries avec des petites pousses (30 à 40 cm en-dessous du haut de la tige) comme le précise le traitement et des pousses matures sans feuilles tendres sont données au lot non traité en suivant les méthodes recommandées.

Détails du traitement :

T1 - alimentation avec des pousses tendres pendant un jour, suivie par des pousses matures sans feuilles tendres.

T2 - alimentation avec des pousses tendres pendant deux jours, suivie par des pousses matures sans feuilles tendres.

T3 - alimentation avec des pousses tendres pendant trois jours, suivie par des pousses matures sans feuilles tendres

T4 - alimentation avec des pousses tendres pendant quatre jours, suivie par des pousses matures sans feuilles tendres

T5 - alimentation avec des pousses tendres pendant cinq jours, suivie par des pousses matures sans feuilles tendres

T6 - alimentation avec des pousses tendres pendant tout le cinquième âge.

T7 - alimentation avec des pousses matures sans feuilles tendres (témoin).

Les recommandations de Krishnaswami et coll., 1973 ont été suivies en ce qui concerne l'espacement des vers, la montée des larves au filage et la récolte des cocons.

Les données sont enregistrées pour les paramètres tels que le poids de la coque, la richesse soyeuse, la longueur du filament, le poids du filament de soie et le titre. Les données recueillies

pendant différentes saisons pour cette étude sont analysées de manière statistique en adoptant un schéma factoriel aléatoire d'après la suggestion de Gomez et Gomez (1984).

RESULTATS

Les résultats sont présentés ci-dessous.

Poids de la coque (g) - Tableau I :

On remarque des différences significatives par rapport au poids de la coque chez toutes les lignées pendant toutes les saisons. Les larves nourries avec des pousses tendres enregistrent un poids maximum en T3 (2,76g) puis en T2 (2,48g), T1 (2,30 g), T7 (2,22 g), T4 (2,18g), T5 (1,85 g) et T6 (1,75 g) et tous les traitements diffèrent l'un de l'autre de manière significative. Parmi les saisons, un poids de coque significativement plus élevé (2,54 g) est enregistré pendant l'hiver, suivi par l'été (2,23 g) et la saison des pluies (1,89 g). Cependant, le poids de la coque varie en fonction des lignées, NB₄D₂ donne le poids de coque le plus élevé (2,72 g), suivi par PM × NB₄D₂ (2,55 g) et PM (1,38 g) et toutes les lignées diffèrent de manière significative les unes des autres. L'interaction entre les traitements et les saisons est significative. Le poids de coque le plus élevé est enregistré en T3 (3,06 g) pendant l'hiver, ce qui est supérieur de manière significative au reste des combinaisons de traitements et de saisons. L'interaction entre les traitements et les lignées est significative. Le poids de coque maximum est enregistré chez NB₄D₂ (3,29 g) et PM × NB₄D₂ (3,24 g) en T3, qui sont significativement supérieurs par rapport aux autres combinaisons de traitement × lignée. Il y a une différence significative due à l'interaction entre saisons et lignées. Le poids de coque significativement le plus élevé est enregistré en hiver (3,15 g) chez NB₄D₂. L'interaction globale entre traitements, saisons et lignées est aussi significative. Le poids maximum de la coque est enregistré avec T3 (3,74 g) pendant la saison d'hiver chez NB₄D₂, ce qui est supérieur de manière significative aux autres combinaisons.

Richesse soyeuse (%) - Tableau II :

Pour la richesse soyeuse, l'influence de la nourriture avec des pousses tendres diffère chez toutes les lignées et les saisons. La richesse soyeuse est la plus élevée chez T3 (16,41 %), suivie par T2 (15,63 %), T1 (15,25 %), T7 (14,97 %), T4 (14,73 %), T5 (13,54 %) et T6 (13,16 %) et tous les traitements diffèrent de manière significative l'un de l'autre sauf T4 et T7 qui sont égaux. Parmi les saisons, la richesse soyeuse la plus élevée (15,62 %) est enregistrée pendant l'hiver, suivie par l'été (14,91 %) et la saison des pluies (13,90 %). De plus, la richesse soyeuse varie avec les lignées et NB₄D₂ enregistre la richesse soyeuse significativement la plus élevée (16,13 %), suivie par PM × NB₄D₂ (15,88 %) et PM (12,43 %). L'interaction entre les traitements et les saisons n'est pas significative. Cependant, on observe des différences significatives quant à l'interaction entre les traitements et les lignées et la richesse soyeuse maximum est enregistrée chez PM × NB₄D₂ (17,90 %) et NB₄D₂ (17,55 %) avec T3 qui sont significativement supérieures aux autres combinaisons de traitement et de lignée. Il y a une différence significative due à l'interaction des saisons et des lignées et la richesse soyeuse significativement la plus élevée est enregistrée pendant l'hiver (17,26 %) chez NB₄D₂. L'interaction globale entre traitements, saisons et lignées est aussi significative. La richesse soyeuse maximum est enregistrée avec T3 pendant l'hiver chez NB₄D₂ (18,26 %), qui est similaire à T2 chez NB₄D₂ et son hybride, T7 pour NB₄D₂ et son hybride pendant l'hiver (17,63 à 17,79 %) et T3 pour PM × NB₄D₂ (17,63 à 18,12 %) pendant toutes les saisons étudiées.

Longueur du filament de soie (m) - Tableau III :

L'effet de l'alimentation avec des pousses tendres est significatif pour toutes les lignées et les saisons étudiées. La longueur la plus importante du filament est enregistrée chez T3 (755,99 m) qui est supérieure de manière significative à T2 (733,10m), à T1 (715,79 m), à T7 (705,66 m) à T4

(682,99), T5 (653,07 m) et à T6 (640 m). Parmi les saisons différentes, la longueur du filament significativement la plus élevée est enregistrée pendant l'hiver (718,59 m), suivie par l'été (700,88 m) et la saison des pluies (674,77 m). Cependant, la longueur du filament varie avec les lignées, le filament le plus long est enregistré chez NB4D2 (1012,69 m) qui est significativement supérieur à PM × NB4D2 (681,08 m) et PM (400,47 m). L'interaction entre le traitement et la saison est significative. La longueur du filament maximum est enregistrée chez T3 (771,87 m) pendant l'hiver ce qui est supérieur de manière significative aux autres combinaisons de traitements et saisons. On remarque une interaction significative entre traitements et lignées. La longueur du filament la plus importante est enregistrée chez T3 (1 101,91 m) chez NB4D2, qui est supérieure de manière significative au reste des combinaisons. L'interaction entre saisons et lignées révèle des différences significatives. Pendant l'hiver, on observe la longueur la plus importante du filament chez NB4D2 (1 044,49 m) qui est supérieure de manière significative au reste des combinaisons de saisons et de lignées. L'interaction globale entre traitements, saisons et lignées révèle des différences significatives. Le filament le plus long est enregistré avec T3 (1 125,22m) pendant la saison d'hiver chez NB4D2.

Poids du filament de soie (g) - Tableau V :

L'influence de l'alimentation avec des pousses tendres est significative pour toutes les lignées et saisons testées. Les larves nourries avec des pousses tendres enregistrent le poids du filament le plus élevé chez T2 et T3 (0,19 g) suivies par T1 et T7 (0,18 g), T4 et T5 (0,17 g). De manière significative le poids du filament le plus faible est enregistré chez T6 (0,16 g). Parmi les différentes saisons, le poids maximum du filament est enregistré pendant l'hiver et l'été (0,18 g), qui sont significativement supérieurs à celui obtenu pendant la saison des pluies (0,17g). Parmi les différentes lignées, le poids du filament significativement le plus élevé est obtenu chez NB4D2 (0,25 g) suivi par PM × NB4D2 et PM (0,10g). L'interaction entre les traitements et les saisons révèle des différences significatives. Le poids maximum du filament est enregistré avec T3 (0,19 g) pour toutes les saisons et T2 (0,19 g) pendant l'hiver et l'été, qui sont significativement supérieurs par rapport aux autres combinaisons. L'interaction entre les traitements et les lignées est significative. Le poids du filament significativement le plus élevé est enregistré avec T2 et T3 (0,27 g) pour NB4D2, qui sont supérieurs aux autres combinaisons. On observe des différences significatives par rapport à l'interaction entre la saison et la lignée. Le poids maximum du filament est enregistré en hiver chez NB4D2 (0,26 g) qui est supérieur de manière significative aux autres combinaisons. L'interaction globale entre traitements, saisons et lignées est significative. Le poids maximum du filament est enregistré pour T2 pendant l'hiver et l'été et pour T3 pendant l'hiver et la saison des pluies pour NB4D2 (0,27g) qui sont supérieurs de manière significative aux autres combinaisons.

Titre - Tableau V :

L'effet de l'alimentation avec des pousses tendres testé sur les larves produit des différences significatives entre toutes les lignées et les saisons. Le titre le plus bas est enregistré avec T3 (2,27), il est significativement différent de T2 (2,29), T1 (2,30) T4 et T7 (2,31), T5 (2,33) et T6 (2,34) et tous les traitements diffèrent de manière significative entre eux sauf T4 et T7 qui sont égaux. Parmi les saisons, le titre le plus bas est enregistré en hiver (2,29) suivi par l'été (2,30) et la saison des pluies (2,32). De plus, le titre varie avec les lignées et NB4D2 enregistre le titre le plus bas (2,25) suivi par PM × NB4D2 (2,31) et PM (2,36). L'interaction entre les traitements et les saisons est significative et le titre le plus bas est enregistré avec T3 (2,26) pendant l'hiver, ce qui est significativement supérieur au reste des combinaisons entre traitements et saisons. L'interaction entre les traitements et les lignées est significative et le titre le plus bas est enregistré avec T3 (2,22) chez NB4D2 qui est significativement différent des autres combinaisons de traitement et de lignée. Il y a une différence significative due à l'interaction entre la saison et la lignée, le titre significativement le plus bas étant enregistré en hiver (2,23) chez NB4D2, qui diffère significativement des autres combinaisons. L'interaction globale entre

traitements, saisons et lignées est aussi significative. Le titre le plus bas est enregistré avec T3 (2,20) chez NB4D2 pendant l'hiver.

DISCUSSION

L'alimentation du ver à soie du cinquième âge avec des pousses tendres jusqu'au troisième jour et ensuite avec des pousses adultes (T3) entraîne une augmentation du poids de la coque, de la richesse soyeuse, de la longueur du filament du soie, du poids du filament de soie et du titre. Le poids de la coque est maximum chez les cocons obtenus à partir de larves nourries avec des pousses tendres pendant trois jours T3 (2,76 g) et le poids de la coque le plus bas est enregistré avec T6 (1,75 g). Le poids de la coque le plus élevé est enregistré pendant l'hiver. Ces résultats confirment ceux de Krishnaswami et coll., (1970) ; Narayanan et coll., (1967) ; Anonyme (1980). De plus, le poids de cocon comparativement plus faible obtenu avec T7 (2,22) est peut être dû à l'alimentation avec des pousses adultes, cette observation confirme les études de Jadhav (1989) qui a observé que l'alimentation avec des feuilles adultes diminue le poids du cocon, le poids de la nymphe et le poids de la coque. Qader et coll., (1992) ont observé que l'alimentation avec des feuilles tendres améliore le poids de la coque et l'alimentation avec des feuilles dures entraîne une mauvaise performance des caractères du cocon. Le poids plus faible observé avec T6 est confirmé par Bergold (1963) et Shivaprakasam et coll., (1996), selon eux il se produit une acidité accrue des fluides corporels et une multiplication des virus qui entraîne une propagation élevée des maladies. Cela peut entraîner une mauvaise construction du cocon, qui en dernier ressort a un poids de coque inférieur. De manière significative, la richesse soyeuse la plus élevée est obtenue avec T3 (16,41 %) tandis que la plus faible est enregistrée pour T6 (13,16 %). La richesse soyeuse est plus élevée en hiver. Ces observations sont en accord avec celles de Singh et coll. (1994), qui ont signalé une richesse soyeuse plus élevée pour la lignée bivoltine NB4D2. Rajashekargouda et Lakshmikanth (1998) ont observé que l'alimentation avec des feuilles tendres fait passer la richesse soyeuse de 14,99 à 16,19 % chez PM × NB4D2, par comparaison aux pratiques recommandées, et cela est plus ou moins en accord avec nos observations. Dans notre étude, le filament de soie le plus long 755,99 m et le poids le plus élevé (0,19 g) sont obtenus avec T3. Le filament le moins long (640 m) et le poids le plus faible (0,16 g) sont observés avec T6. Les larves du cinquième âge nourries avec des pousses tendres pendant trois jours ont peut être accumulé une teneur en fibroïne plus élevée, ce qui a pu entraîner une longueur de filament et un poids plus élevés avec T3, ce qui est plus ou moins similaire à l'observation de Qader (1995), qui a signalé que la teneur en soie dans la glande séricigène postérieure de *Bombyx mori* L. augmente quand les vers à soie sont nourris avec des feuilles tendres. De plus nos résultats sont plus ou moins en accord avec les observations de Hanif et Islam (1987) qui ont observé les poids et longueur du fil de soie les plus élevés quand les larves de *B. mori* sont élevées avec des feuilles de premier et quatrième ordre. Qui plus est, Rajashekargouda et Lakshmikanth (1998) ont aussi confirmé que l'alimentation des vers à soie du cinquième âge avec des feuilles tendres entraîne une augmentation de la longueur et du poids du filament de soie par comparaison à une alimentation normale (ensemble des pratiques recommandées). Pendant l'hiver, le titre le plus bas est enregistré chez les cocons obtenus à partir de larves nourries avec des pousses tendres pendant trois jours puis avec des pousses tendres sans feuilles adultes T3 (2,27) tandis qu'avec T6, le titre est le plus élevé (2,34). Nos résultats confirment les rapports de Rajashekargouda et Lakshmikanth (1998) qui ont observé que l'alimentation des larves du cinquième âge avec des feuilles tendres donne le titre le plus faible par comparaison avec l'ensemble des pratiques recommandées.

En conclusion, l'alimentation des vers à soie du cinquième âge avec des pousses tendres jusqu'au troisième jour et ensuite avec des pousses adultes favorise les paramètres technologiques de la soie.

STUDIES ON POLLEN MORPHOLOGY AND POLLEN GERMINATION IN MULBERRY (*MORUS* SP.)

P.K. TEWARY, R. BALAKRISHNA, V. KUMAR & A. SARKAR

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

Pollen morphology and pollen germination of five elite mulberry genotypes were studied. SEM studies revealed that the shape of the pollen varied from round to slightly elliptical. The exine was papillate. Pollen size varied from 11 - 13 μ m in diameter. Germ pore was round consisting of beak like structure in the centre. For pollen germination, sucrose (2 %) + Boric acid (100 ppm) was found better than with sucrose (2 %, 5 %) alone. Moreover, addition of polyethylene glycol at 10 % level in sucrose (2 %) + Boric acid (100 ppm) solution was found to be the best for germination in all the genotypes tested. Sixty to eighty percent germination was recorded in this medium. Hence, such protocol was recommended as the most suitable one for pollen germination in mulberry genotypes.

Keywords : Pollen morphology, germination, polyethylene glycol, mulberry, SEM.

INTRODUCTION

More than 60 percent of the genes expressed in an individual of a species are also expressed in its pollen grains (Tanksley *et al.*, 1981). Hence, the pollen grain which possesses all the genetic potentialities of the plant can be utilised in various kinds of studies. Apart from its utility in breeding programme, pollen grains of certain taxa have been used in studies on tolerance to ozone, patho-and-phyto-toxins, herbicides, heavy metals, salinity and low & high temperatures (Shivanna and Sawhney, 1993).

Mulberry (*Morus* sp.) is an important plant in sericulture industry as its foliage constitute chief food for the mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.). Improvement in mulberry varieties is a continuous process which is mainly done through conventional breeding technique. As pollination is an essential component of breeding, hence, pollen studies of breeding stocks should be the important pre-requisite. A few attempts have been made earlier in this regard by Das *et al.*, (1970) and Suhasini *et al.*, (1985). However, there is plenty of scope to study those useful varieties further which are currently being utilised in the breeding programmes.

Under the present investigation, pollen belonging to 5 elite mulberry varieties has been studied morphologically and their viability have been tested on various media. Effect of specific stress inducing chemicals on pollen germination were also studied.

MATERIALS AND METHODS

Five improved mulberry varieties belonging to *Morus indica* i.e., V1, S13, S34, RFS-135 and S799 grown at Institute campus have been selected as source material. Male inflorescence were collected during morning hours (about 9 am) and pollen grains from several anthers were dehiscenced in the laboratory after 1-2 hours of storage at normal room temperature.

Preparation for electron microscopy:

The pollen grains of different varieties were fixed in 2.5 % glutaraldehyde prepared in 0.2 M sodium cacodylate buffer and dehydrated in a graded series of alcohol-acetone at room temperature. The dehydrated material was dried in critical point dryer (EMS-850) and then mounted onto copper stubs with a double sided sticky tape. The mounted specimens were coated with 20 nm thickness of gold in a sputter coat (EMS-550) and examined under electron microscope JEOL 100 CX-II ASID-4D at 20 kV.

Pollen culture:

Pollen dust of individual variety was collected separately and sitting drop cultures (Shivanna and Rangaswamy, 1992) were raised on cleaned cover slips rested on glass slides. The slides were kept in 15 cm diameter petridish lined with moist filter paper at bottom and top to provide appropriate humidity (RH 60-70 %). At first, 7 different media consisting sucrose alone, sucrose + boric acid, sucrose + calcium nitrate, sucrose + boric acid + calcium nitrate and sucrose + phenyle boric acid were tested. The best medium for pollen germination was selected thereafter for further testing in supplementation with five different concentrations of polyethylene glycol (PEG) (5, 10, 20, 30 & 40 %) and three concentrations of sodium chloride (NaCl) (0.1, 0.5, 1.0 %) separately. For each treatment (medium), 4 cultures (drops) of each genotype were raised. Pollen germination data was recorded after 5 hours. At least, 3 microscopic fields in each drop were studied and the mean was calculated in terms of percentage.

RESULTS AND DISCUSSION

Pollen grains of all the varieties studied were found alike in morphological features. They were either globular or slightly elliptical in shape (Fig. 1A, D). The exine was papillate and papillae were corn shaped (Fig. 1B, E). Papillae were distributed uniformly throughout the surface of the pollen. Fujita and Uchikawa (1986) have recorded difference in papilla density among the mulberry cultivars, however, no such difference was observed in the present genotypes (except in S13 where the density was found little low). The size of pollen did not vary considerably among the varieties. It ranged 11-13 μ m in diameter.

The germ pore was round in shape consisting a beak like structure in the centre (Fig. 1C, F). The size of germ pore ranged 1.3 - 1.5 μ m in diameter. Usually pollen grains were found triporate, occasionally diporate pollen (Fig. 2) was also observed.

Pollen of 5 elite genotypes when tested on 7 different nutrient media, showed wide variation in germination percentage (Table 1). Unlike 90 % pollen germination recorded in 2 % sucrose solution in certain exotic mulberry cultivars (Das and Katagiri, 1968), none of the present elite indigenous genotypes exhibited high germination in 2 % sucrose rather it ranged 7.35 (S13) - 19.00 % (RFS-135) only. Increase in sucrose concentration to 5 % completely inhibited pollen tube initiation. Addition of boric acid and phenyle boric acid at 100 ppm in 5 % and 2 % sucrose solutions respectively could not induce pollen germination in any of the genotypes tested. Though calcium was found having stimulatory effect on pollen germination in various crops like *Triticum vulgare*, *Zea mays*, *Sorghum vulgare* (Swaminathan, 1969), addition of calcium nitrate at 300 ppm to 2 % sucrose and to 2 % sucrose + 100 ppm boric acid did not reflect enhancement in pollen germination under the present investigation. The maximum enhancement of 22.85 % germination was recorded in V1 variety. This confirms the finding of Suhasini *et al.* (1985) that calcium complex does not play effective role in pollen germination in mulberry. Out of all the seven media tested, sucrose at 2 % concentration supplemented with 100 ppm of boric acid, resulted higher pollen germination. A minimum of 30.10 % pollen germination was recorded in S34, whereas the maximum of 52.15 % germination was recorded in V1 variety.

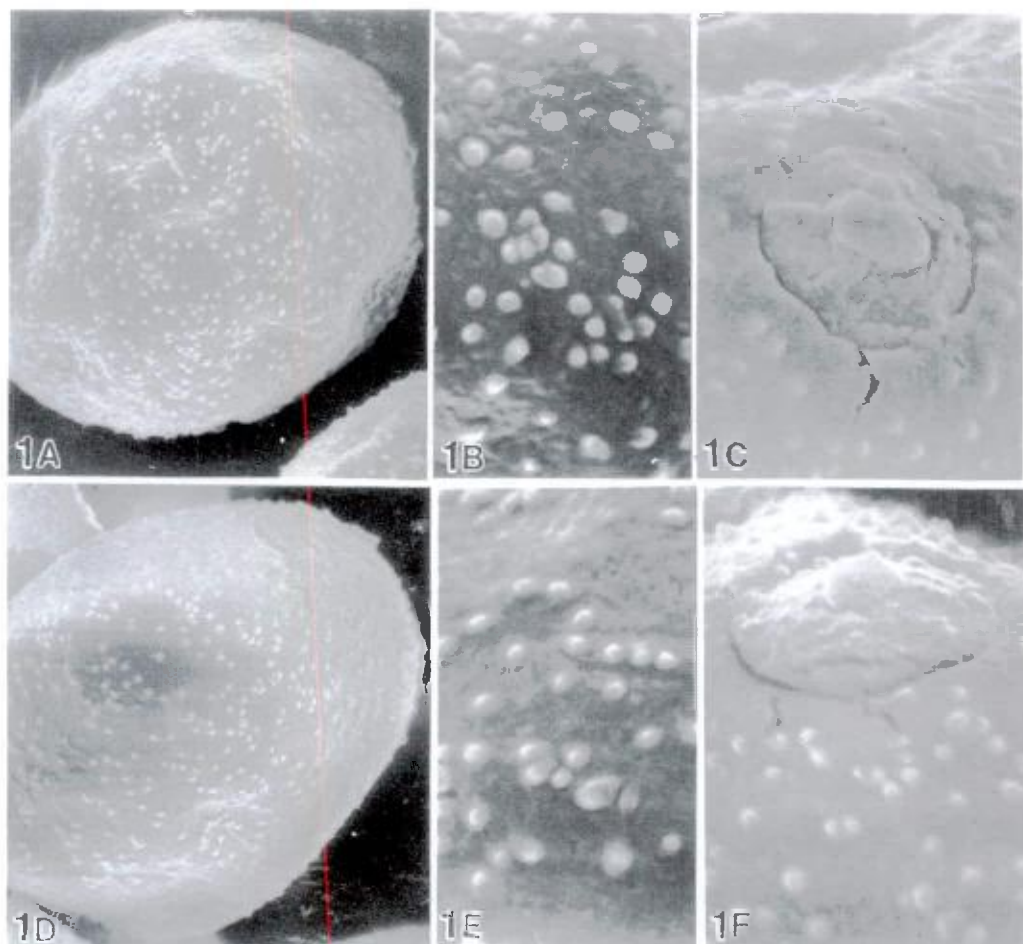


Fig. 1. Scanning electron microphotographs of pollen grains of two elite mulberry varieties i.e., V1 (variety recommended for irrigated condition) and S13 (variety recommended for rainfed condition).

Fig. 1. Microphotographies électroniques à balayage de grains de pollen de deux variétés de mûrier, i.e., V1 (variété recommandée pour des conditions d'irrigation) et S13 (variété recommandée pour des conditions pluvieuses)

Fig. A. Surface morphology of a pollen grain of V1 ($\times 5,000$). / **Fig. A.** Morphologie de la surface d'un grain de pollen de V1 ($\times 5,000$).

Fig. B. Enlarged view of exine of V1 pollen showing papilla ($\times 15,000$). / **Fig. B.** Vue agrandie d'une exine de pollen de V1 montrant une papille ($\times 15,000$).

Fig. C. Germ pore showing a beak like structure in V1 ($\times 15,000$). / **Fig. C.** Pore germinatif chez V1 avec une structure en forme de bec ($\times 15,000$).

Fig. D. Surface morphology of a pollen grain in S13 ($\times 5,000$). / **Fig. D.** Morphologie de la surface d'un grain de pollen chez S13 ($\times 5,000$).

Fig. E. Enlarged view of exine of S13 pollen showing papilla ($\times 15,000$). / **Fig. E.** Vue agrandie d'une exine de pollen chez S13 montrant une papille ($\times 15,000$).

Fig. F. Germ pore showing a beak like structure in S13 ($\times 15,000$). / **Fig. F.** Pore germinatif chez S13 montrant une structure en forme de bec ($\times 15,000$).

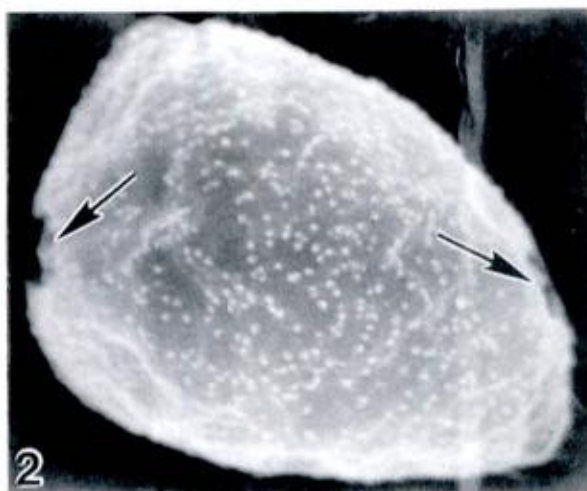


Fig. 2. Scanning electron microphotograph of diporate pollen grain.

Fig. 2. Microphotographie à balayage d'un grain de pollen à deux pores.

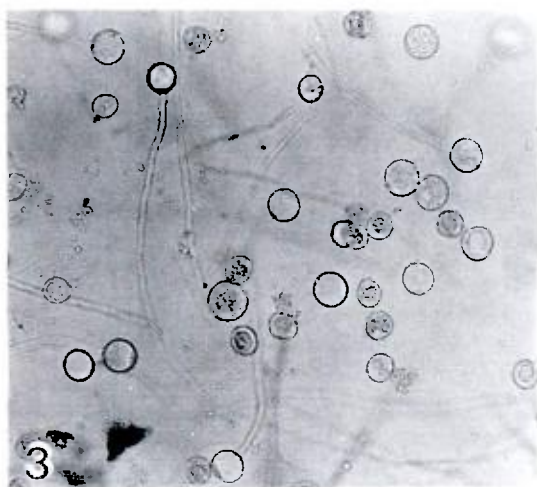


Fig. 3. Pollen germination (V1 genotype) on nutrient medium (sucrose 2 % + Boric acid 100 ppm) supplemented with PEG 10 % using sitting drop method.

Fig. 3. Germination de pollen (génotype V1) sur milieu nutritif (saccharose 2 % + Acide borique 100 ppm) complété de 10 % PEG utilisant la méthode de la goutte pendante.

As the above media could not yield substantial high pollen germination, hence attempt was made to test other kind of chemicals in order to develop optimal medium. Stress inducing chemicals i.e., sodium chloride (salt stress) and Polyethylene glycol (Osmotic stress) were tested in supplementation with sucrose 2 % + boric acid 100 ppm. Sodium chloride was found affecting adversely the pollen germination, even as lowest concentration of NaCl (0.1 %) completely inhibited tube initiation. Unlike salt stress, when osmotic stress was applied to the pollen by using different concentrations of PEG

(5.0 - 40.0 %), a remarkable increase in pollen germination was observed at 10 % PEG supplementation in the medium over control (Table II). This increase was registered in all the varieties irrespective of their nature of tolerance to osmotic stress. The lowest of 60.35 % and highest of 85.85 % pollen germination were recorded in S13 and V1 varieties respectively (Fig. 3). Further, increase in PEG concentration to 40 % level reduced the pollen germination to nil.

Table I. Percentage of pollen germination in 5 mulberry genotypes in different nutrient media.

Tableau I. Pourcentage de germination de pollen chez 5 géotypes du mûrier dans différents milieux nutritifs.

Genotype		Percentage of pollen germination in nutrient media						
Sl. No.		Sucrose 2 %	Sucrose 5 %	Sucrose 2 % + boric acid 100ppm	Sucrose 5 % + boric acid 100 ppm	Sucrose 2 % + calcium nitrate 300 ppm	Sucrose 2 % + boric acid 100 ppm + calcium nitrate 300 ppm	Sucrose 2 % + phenyl boric acid 100 ppm
Géotype		Pourcentage de germination de pollen dans les milieux nutritifs						
No de série		Saccharose 2 %	Sucrose 5 %	Sucrose 2 % + acide borique 100ppm	Sucrose 5 % + acide borique 100 ppm	Sucrose 2 % + nitrate de calcium 300 ppm	Sucrose 2 % + acide borique 100 ppm + nitrate de calcium 300 ppm	Sucrose 2 % + acide phényl borique 100ppm
1	S13	7.35 ± 1.3	0.0	33.25 ± 1.8	0.0	2.50 ± 2.3	12.55 ± 1.9	0.0
2	S34	6.40 ± 1.4	0.0	30.10 ± 0.7	0.0	3.65 ± 2.4	10.00 ± 2.1	0.0
3	RFS-135	19.00 ± 0.9	0.0	45.30 ± 0.9	0.0	6.35 ± 1.8	18.40 ± 2.3	0.0
4	V1	16.65 ± 0.6	0.0	52.15 ± 0.9	0.0	7.30 ± 1.7	22.85 ± 1.3	0.0
5	S799	8.75 ± 1.7	0.0	41.45 ± 1.7	0.0	4.55 ± 2.1	20.15 ± 1.7	0.0

Table II. Percentage of pollen germination in 5 mulberry genotypes in PEG supplemented nutrient media.

Tableau II. Pourcentage de germination de pollen chez 5 génotypes du mûrier dans des milieux nutritifs additionnés de PEG

Sl No.	Genotype Génotype	Percentage of pollen germination in different PEG concentration in nutrient medium*					
		% de germination de pollen à différentes concentrations de PEG dans le milieu*					
No. de série		Control 0 % Témoin 0 %	5.0 %	10.0 %	20.0 %	30.0 %	40.0 %
1	S13	30.10 ± 0.8	41.90 ± 2.1	60.35 ± 0.9	28.15 ± 1.3	10.0 ± 3.3	0.0
2	S34	28.65 ± 1.4	37.20 ± 1.8	55.00 ± 0.6	0.0	0.0	0.0
3	RFS-135	43.15 ± 1.7	60.15 ± 2.3	80.75 ± 1.3	22.95 ± 2.4	12.0 ± 3.1	0.0
4	V1	50.10 ± 1.1	65.35 ± 1.6	85.85 ± 0.7	55.50 ± 1.9	31.0 ± 3.8	0.0
5	S799	37.25 ± 0.9	51.45 ± 1.7	73.60 ± 0.8	20.00 ± 2.2	0.0	0.0

* Nutrient medium: Sucrose 2 % + Boric acid 100 ppm./ * milieu nutritif: Saccharose 2 % + Acide borique 100 ppm.

Envisaging the above findings, it is thus evident that addition of PEG at 10 % concentration in the nutrient medium (sucrose 2 % + boric acid 100 ppm) can be used to achieve high pollen germination in mulberry, although germination percentage will differ among the genotypes.

ACKNOWLEDGEMENT

Thanks are due to Dr R. K. Datta, Director, CSRTI, Mysore for providing facilities and encouragement.

REFERENCES

- DAS B.C., KATAGIRI K. (1968) Germination and storage of mulberry pollen. Acta. Sericologia 69, 18-23.
- DAS B.C., PRASAD D.N., KRISHNASWAMI S. (1970) Studies on anthesis in mulberry. Indian J. Seric. 9(1), 59-63.
- FUJITA H., UCHIKAWA C. (1986) Electron microscopical study of mulberry with special reference to the identification of cultivars. In : Development of new technology for identification and classification of tree crops and ornamentals. KITAURA K., AKIHAMA T., KUKIMURA H., NAKAJIMA K., HORIE M. AND KOZAKI I. (Eds.), MAFF, Japan. pp. 116.
- SHIVANNA K.R., RANGASWAMY N.S. (1992) Pollen Biology : A laboratory manual. Springer, Berlin Heidelberg, New York.

- SHIVANNA K.R., SAWHNEY V.K. (1993) Pollen selection for *Alternaria* resistance in oilseed *Brassicas*: Responses of pollen grains and leaves to a toxin of *Alternaria brassicae*. Theor. Appl. Genet. 86, 339-344.
- SWAMINATHAN M.S. (1969) Viability of pollen storage methods and serological classification. A technical report, Genetics Division, IARI, New Dehli.
- SUHASINI K., SUSHEELAMMA B.N., GIRIDHAR K., RAJAGOPALAN RAJU (1985) Germination of mulberry pollen. Indian J. Seric., 84-86.
- TANKSLEY S.D., ZAMIR D., RICK C.M. (1981) Evidence for extensive overlap of saprophytic and gametophytic gene expression in tomato. Science 213, 453-455.

ETUDES SUR LA MORPHOLOGIE ET LA GERMINATION DU POLLEN CHEZ LE MURIER (*MORUS* SP.)

P.K. TEWARY, R. BALAKRISHNA, V. KUMAR & A. SARKAR

Central Sericultural Research & Training Institute, Srirampura, Mysore - 570 008, Inde.

La morphologie et la germination du pollen de cinq géotypes de mûrier supérieurs ont été étudiées. Les études en microscopie électronique à balayage (SEM) révèlent que la forme du pollen varie, elle peut être ronde ou légèrement elliptique. L'exine présente des papilles. La taille du pollen varie entre 11 à 13 µm de diamètre. Le pore germinatif est rond et constitué d'une structure en forme de bec dans le centre. Pour la germination du pollen, le saccharose (2 %) + de l'acide borique (100 ppm) s'avèrent meilleurs que du saccharose seul (2 %, 5 %). De plus, l'ajout de polyéthylène glycol à un niveau de 10 % au saccharose (2 %) + solution d'acide borique (100 ppm) donne la meilleure germination chez tous les géotypes testés. Une germination de soixante à quatre vingt pour-cent a été enregistrée dans ce milieu. Ce protocole a donc été recommandé comme le plus adapté pour la germination du pollen chez les géotypes de mûrier.

INTRODUCTION

Plus de soixante pour cent des gènes qui sont exprimés chez un individu d'une espèce sont aussi exprimés dans ses grains de pollen (Tanksley et coll., 1981). Ainsi, comme le grain de pollen possède toutes les potentialités génétiques de la plante, il peut être utilisé dans divers types d'études. Les grains de pollen sont utiles non seulement pour les programmes de breeding mais les grains de pollen de certains taxons sont aussi utilisés dans des études sur la tolérance à l'ozone, aux patho-toxines, aux phyto-toxines, aux herbicides, aux métaux lourds, à la salinité et aux températures basses et élevées (Shivanna et Sawhney, 1993).

Le mûrier (*Morus* sp.) est une plante importante pour l'industrie séricicole car son feuillage constitue la principale nourriture du ver à soie mûrier (*Bombyx mori* L.). L'amélioration des variétés de mûrier est un processus continu, obtenu la plupart du temps grâce à des techniques de lignage conventionnelles. Comme la pollinisation est un élément essentiel du lignage, les études sur le pollen des souches devraient être une étape préalable importante. Quelques essais ont été faits précédemment à cet égard par Das et coll., (1970) et Suhasini et coll., (1985). Cependant, il existe un champ d'investigation très large pour étudier plus en détail les variétés utiles qui sont actuellement utilisées dans les programmes de breeding.

Dans cette étude, le pollen appartenant à 5 variétés de mûrier supérieures a été étudié morphologiquement et sa viabilité a été testé sur des milieux différents. L'effet de produits chimiques entraînant des agressions spécifiques sur la germination du pollen a aussi été étudié.

MATERIELS ET METHODES

Cinq variétés de mûrier améliorées appartenant à *Morus indica* c'est à dire V1, S13, S34, RFS-135, et S799 cultivées sur le campus de l'institut ont été sélectionnées comme matériels source. Les inflorescences mâles ont été recueillies le matin (à environ 9 heures) et les anthères ont été ouvertes en laboratoire après avoir été stockées 1 à 2 heures à température ambiante.

Préparation pour la microscopie électronique :

Les grains de pollen de différentes variétés ont été fixés dans de la glutaraldehyde à 2,5 %, préparée dans un tampon de cacodylate de sodium à 0,2 M et déshydratée dans une série d'acétone-alcool à température ambiante. Le matériel déshydraté est séché dans un séchoir à point critique (EMS-850) et monté sur talons de cuivre avec du ruban adhésif double face. Les spécimens montés sont recouverts d'une couche d'or de 20 nm avec un pulvérisateur (EMS-550) et examinés sous un microscope électronique JEOL 100 CX-II ASID-4D à 20 kV.

Culture du pollen :

La poudre de pollen de chaque variété est recueillie séparément et les cultures en gouttelettes (Shivanna et Rangaswamy, 1992) sont placées sur des protections propres disposées sur des lames en verre. Les lames sont placées dans des boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre tapissées au fond et au-dessus avec du papier filtre humide pour créer une humidité appropriée (HR 60 à 70 %). Dans un premier temps, on a testé 7 milieux différents à savoir du saccharose seul, du saccharose + de l'acide borique, du saccharose + du nitrate de calcium, du saccharose + de l'acide borique + du nitrate de calcium et du saccharose + de l'acide phényle borique. Le meilleur milieu pour la germination du pollen a été sélectionné pour être à nouveau testé avec l'ajout de cinq concentrations différentes de polyéthylène glycol (PEG) (5, 10, 20, 30 & 40 %) et trois concentrations de chlorure de sodium (NaCl) (0,1 ; 0,5 ; 1 %) séparément. Pour chaque traitement (milieu), on fait pousser 4 cultures (gouttelettes) de chaque génotype. Les données sur la germination du pollen sont enregistrées après 5 heures. Trois champs microscopiques pour chaque goutte ont au moins été étudiés et la moyenne a été calculée en termes de pourcentage.

RESULTATS ET DISCUSSION

Il s'avère que les grains de pollen de toutes les variétés étudiées ont les mêmes traits morphologiques. Ils sont soit globuleux, soit légèrement elliptiques (Fig 1A, D). L'exine présente des papilles en forme de grains de maïs (Fig. 1B, E). Les papilles sont distribuées uniformément sur toute la surface du pollen. Fujita et Uchikawa (1986) ont observé des différences de densité des papilles parmi les cultivars de mûrier, cependant, une telle différence n'a pas été observée chez les génotypes présents (sauf S13 dont la densité s'avère un peu faible). La taille du pollen ne varie pas de manière considérable parmi les variétés. Elle est comprise entre 11 et 13 μm de diamètre.

Le pore germinatif est rond avec une structure en bec dans le centre (Fig 1C, F). La taille du pore germinatif est comprise entre 1,3 à 1,5 μm de diamètre. Habituellement, les grains de pollen sont à trois pores, mais on observe aussi du pollen à deux pores (Fig. 2).

Le pourcentage de germination du pollen de 5 génotypes supérieurs testé sur 7 milieux nutritifs différents, varie fortement (Tableau I). Aucun des génotypes indigènes supérieurs présents ne donne une germination élevée dans du saccharose à 2 %, au contraire elle n'est comprise qu'entre 7,35 (S13) et 19 % (RFS-135) alors que chez certains cultivars de mûriers exotiques (Das et Katagiri, 1968) on a enregistré une germination du pollen de 90 % dans une solution de saccharose à 2 %. L'augmentation de la concentration en saccharose à 5 % inhibe complètement la formation du tube pollinique. L'ajout d'acide borique et d'acide phényle borique à 100 ppm dans des solutions de saccharose à respectivement 5 % et 2 % n'a pas entraîné de germination du pollen chez aucun des génotypes testés. Bien que l'on ait trouvé que le calcium ait un effet stimulant sur la germination du pollen chez plusieurs cultures comme *Triticum vulgare*, *Zea mays*, *Sorghum vulgare* (Swaminathan, 1969), l'ajout de nitrate de calcium à 300 ppm à du saccharose à 2 % et à du saccharose à 2 % + 100 ppm d'acide borique n'a pas amélioré la germination du pollen dans cette étude. L'amélioration maximale de la germination a été enregistrée chez la variété V1 (28,85 %). Cela confirme les observations de Suhasini et coll. (1985) selon lesquelles les composés de calcium ne jouent pas un rôle efficace dans la germination de pollen chez le mûrier. Sur les sept milieux testés, le saccharose à une concentration de 2 %, complété

avec 100 ppm d'acide borique permet d'obtenir la germination de pollen la plus élevée. Un pourcentage de germination du pollen minimum de 30,10 % a été enregistré chez S34, tandis qu'un pourcentage de germination maximum (52,15 %) a été enregistré chez la variété V1.

Comme les milieux ci-dessus n'ont pas donné une germination de pollen vraiment élevée, on a fait des essais pour tester d'autres types de produits chimiques afin de mettre au point un milieu optimum. Des produits chimiques agressifs comme le chlorure de sodium (stress salin) et le polyéthylène glycol (stress osmotique) ont été testés en complément du saccharose à 2 % + 100 ppm d'acide borique. Il s'avère que le chlorure de sodium a un effet adverse sur la germination du pollen, même à la concentration la plus faible de NaCl (0,1 %), qui inhibe complètement la formation du tube pollinique. Contrairement à ce qui se passe avec le stress salin, lorsqu'on fait subir un stress osmotique au pollen en utilisant des concentrations différentes de PEG (5 à 40 %), on a observé une augmentation remarquable de la germination du pollen par rapport au témoin avec un complément de PEG de 10 % dans le milieu (Tableau II). Cette augmentation a été observée chez toutes les variétés, quelle que soit la nature de leur tolérance à l'agression osmotique. La germination du pollen la plus faible (60,35 %) et la plus élevée (85,85 %) sont enregistrées respectivement chez S13 et V1 (Fig. 3). De plus, l'augmentation de la concentration de PEG à 40 % réduit la germination à zéro.

Compte tenu des observations ci-dessus, il est donc évident que l'ajout de PEG à une concentration de 10 % dans le milieu nutritif (saccharose à 2 % + 100 ppm d'acide borique) peut être utilisé pour obtenir une germination du pollen élevée chez le mûrier, bien que le pourcentage de germination varie en fonction des génotypes.

ANTAGONISTIC EFFECT OF *TRICHODERMA* AND *GLIOCLADIUM VIRENS* ON TWO FOLIAR PATHOGENS OF MULBERRY

T. PHILIP*, D. D. SHARMA & H. R. SHIVAPRATAP

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

Antagonistic potentiality of eight isolates of Trichoderma and an isolate of Gliocladium virens was tested in vitro against Colletotrichum gloeosporioides and Pestalotiopsis disseminata. Studies included interaction of biocontrol agents at mycelial and metabolite level with the pathogens. In general, T. harzianum-1 and 2 and T. viride-2 have shown high antagonism against C. gloeosporioides, and P. disseminata inhibiting their mycelial growth, spore production and spore germination. T. harzianum-1 and 2 have produced the maximum inhibition of mycelial growth (50 and 53 mm respectively) of P. disseminata and C. gloeosporioides. Similarly the culture filtrates of these antagonists have inhibited the mycelial growth of these pathogens by about 84% and the spore production and spore germination above 70%. The mechanisms of antagonism in above biocontrol agents were found to be hyperparasitism and antibiosis.

Keywords: Antagonism, *Trichoderma*, Mulberry, Foliar pathogens.

INTRODUCTION

During the last two decades, considerable attention has been paid towards management of plant diseases through biological means. (Papavizas, 1985; Mukhopadhyay, 1987). Biological control of plant diseases using species of *Trichoderma* was by far more effective on soil borne diseases; nevertheless, their ability to interact with pathogens by exhibiting competition, antibiosis and hyperparasitism make it an attractive one for use on foliage too (Lindow, 1985; Blakeman and Fokkema, 1982). The increasing occurrence of fungicide resistance in many foliar pathogens as well as environmental hazards of chemicals demand alternative non-toxic means to manage foliar diseases (Fokkema, 1993). On mulberry, chemical fungicides are reported to have residual toxicity to silkworms even up to 15 days (Siddaramaiah and Prasad, 1978). Biological control is generally considered as safe, cheap and ecofriendly. Shivapratap *et al* (1996) showed that isolates of *T. harzianum* and *T. viride* were highly antagonistic to the mycelial growth, spore production and spore germination of *Cercospora moricola*. In the present study, nine isolates of *Trichoderma* belonging to five species and an isolate of *Gliocladium virens* have been screened *in vitro* against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Pestalotiopsis disseminata* causing black leaf spot and anthracnose respectively on mulberry.

* Central Sericultural Research & Training Institute - Research Extension Centre, Kidangoor Post, Angamaly- 683 572, Ernakulam, Kerala, India.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of pathogens and biocontrol agents:

Leaves infected with *C. gloeosporioides* and *P. disseminata* were collected from Mysore and Kasargode respectively and the pathogens were isolated following the standard methods (Agrios, 1978).

T. harzianum-1 and 2 were isolated from soils of mulberry gardens at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India by the soil dilution plate technique (Waksman, 1927). Rest of the isolates were collected from Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore and Indian Agricultural Research Institute (IARI), New Delhi. Pure cultures of all the pathogens and antagonists were maintained on potato dextrose agar (PDA).

Interaction between biocontrol agents and pathogens:

The interaction between biocontrol agents and *C. gloeosporioides* and *P. disseminata* was studied on PDA medium by the agar plug (Takahashi *et al.*, 1979) and dual culture (Bell *et al.*, 1982) methods.

a. Agar plug method:

Spore suspension of the pathogens in sterilized distilled water obtained from 7 day old cultures were mixed with PDA and poured in 10 cm diameter Petri plates. A 4 mm disc of the antagonists grown on PDA was cut with the help of a sterilized cork borer and kept at the centre of the plate and the whole set was incubated at $28 \pm 2^\circ \text{C}$ for 7 days. Each treatment was replicated thrice. On 7th day the inhibition zone was measured as clear distance between the periphery of agar plug and growth of pathogens from three different angles and the average was taken. The data were subjected to ANOVA.

b. Dual culture method:

4 mm diameter plug of test pathogens and antagonists from the edge of expanding colonies on media were cut with the help of a sterilized corkborer. The paired isolates of antagonists and pathogen were placed on opposite sides 5 cm away from each other on a 10 cm diameter Petri plate, containing about 20 ml of PDA. Paired cultures were incubated at $28 \pm 2^\circ \text{C}$ for 5-7 days and then scored for degree of antagonism on a scale of class 1-5 (Bell *et al.*, 1982) as below:

Class 1: Biocontrol agent completely overgrew the pathogen and covered the entire medium surface - highly antagonist.

Class 2: Biocontrol agent overgrew at least two-third of the medium surface - antagonist.

Class 3: Biocontrol agent and the pathogen each colonized approximately one half of the medium surface and neither organisms appeared to dominate the other-moderately antagonist.

Class 4: The pathogen colonized at least two third of the medium surface and appeared to withstand encroachment by the biocontrol agent - poor antagonist.

Class 5: The pathogen completely overgrew the biocontrol agent and occupied the entire medium surface - not antagonist.

Effect of culture filtrate (metabolites) of biocontrol agents on pathogen growth:

Effect of culture filtrate (metabolites) of antagonists on the *in vitro* growth of pathogens was studied by the food poison method (Sharvelle, 1961). Metabolites of the biocontrol agents were obtained by growing them in potato dextrose broth for 10 days and filtering the culture filtrate through Whatman filter paper No: 42 and repeated centrifugation at 9000 rpm. Pathogens were grown on media amended with 20% metabolites. The pathogen in media without culture filtrate served as control. Each treatment and control were replicated thrice. The plates were incubated at $28 \pm 2^\circ \text{C}$ for 7 days. Growth of the pathogen in the media influenced by the culture filtrate of the biocontrol agents was measured on the 7th day and compared with that of control.

Effect of culture filtrate of biocontrol agents on spore production and spore germination of the pathogens:

From the above set of experiments, a 4 mm mycelial disk of the pathogens was cut randomly from different places and macerated thoroughly in 1 ml sterilized distilled water to release the spores. The average number of spores per ml spore suspension per microscopic field ($\times 450$) was counted from 30 observations in treated and control sets to determine the inhibition in spore production. The effect of metabolites on spore germination of the pathogens was studied by the hanging drop method (Brian, 1960). The percentage inhibition in mycelial growth, spore production and germination was calculated by the formula of Vincent (1947).

RESULTS

Interaction between biocontrol agents and pathogens:

a. Agar plug method:

The biocontrol agents produced inhibition zone ranging from 15.0 to 52.93 mm against *C. gloeosporioides* and from 15.08 to 50.00 mm against *P. disseminata* (Table I).

T. harzianum isolate 2 produced the maximum inhibition against *C. gloeosporioides* followed by *T. harzianum* isolate 1 (45.90 mm) and *T. longibrachiatum* (43.58 mm). *T. koningii* was least effective against *C. gloeosporioides*. In general, all the isolates tested have shown weak to strong inhibition against *C. gloeosporioides*.

In case of *P. disseminata*, maximum inhibition was exhibited by *T. harzianum* isolate-1 (50 mm) followed by *T. koningii* (43.50 mm), *T. viride* isolate-2 (38.73 mm) and *T. harzianum* isolate-2 (37.68 mm). *T. viride* isolate-1 was least effective producing a weak zone of 15.08 mm.

b. Dual culture method:

Only *T. viride*-2 has shown high antagonism against *C. gloeosporioides*, while *T. harzianum* isolate-1 and 2, *T. viride* isolate-1, *T. koningii* and *T. pseudokoningii* were grouped as antagonists. *G. virens* was a poor antagonist while *T. hamatum* and *T. longibrachiatum* were not antagonists.

In case of *P. disseminata*, *T. viride*-2 and *T. harzianum*-2 have shown high antagonism. *T. harzianum*-1, *T. viride*-1 and *T. koningii* were antagonists. *G. virens* was moderate antagonist, while *T. longibrachiatum* and *T. hamatum* were not antagonists.

Among all the antagonists tested, *T. viride*-2 has shown high antagonism against both the pathogens in dual culture method (Table I).

Effect of metabolites of antagonists on mycelial growth of pathogens:

Metabolites of all the biocontrol agents inhibited the growth of the test pathogen in varying degrees. In case of *C. gloeosporioides*, the percentage inhibition varied from 38.66 to 83.76. Maximum inhibition was produced by the metabolite of *T. harzianum*-2 followed by that of *T. viride*-2 (69.32%), *T. harzianum*-1 (62.22%) and *G. virens* (61.96%). *T. hamatum* was the least effective.

In case of *P. disseminata*, percentage inhibition varied from 27.10 to 84.00. Maximum inhibition was produced by the metabolite of *T. harzianum*-1, followed by *T. hamatum* (77.61%) and *T. harzianum*-2 (74.62%). Least inhibitive was the metabolite of *T. pseudokoningii*. In general, metabolites of all the biocontrol agents were comparatively more effective to inhibit the growth of *C. gloeosporioides* than *P. disseminata* (Table I).

Effect of metabolites on spore production and germination of pathogens.

The metabolites of all the biocontrol agents have reduced the spore production of both the test pathogens in the media (Table II). Percentage reduction in spore production of *C. gloeosporioides* varied from 22.3% to 76.06%. Maximum reduction was obtained using the metabolites of *T.*

harzianum-2, followed by *T. viride*-2 (66.55%) and *T. harzianum*-1 (63.85%). Least effective was *T. pseudokoningii*.

Table I. Interaction of biocontrol agent with *C. gloeosporioides* and *P. disseminata*.

Tableau I. Interaction de l'agent de lutte biologique avec *C. gloeosporioides* et *P. disseminata*.

Sl no	Methods							
Biocontrol agents	Agar plug (mean inhibition zone in mm)		Dual culture (class)		Culture filtrate (colony diam in mm)		Inhibition over control (%)	
	C. g	P. d	C. g	P. d	C. g	P. d	C. g	P. d
N° de série	Méthodes							
Agents de lutte biologique	Tampon d'agar (zone moyenne d'inhibition en mm)		Culture couplée (classe)		Filtrat de culture (diam. de la colonie en mm)		Degré d'inhibition par rapport aux témoins (%)	
	C. g	P. d	C. g	P. d	C. g	P. d	C. g	P. d
1. <i>G. virens</i>	30.14	16.35	4	3	19.12	22.0	61.96	57.79
2. <i>T. harzianum</i> -1	45.90	50.00	2	2	18.89	8.34	62.22	84.00
3. <i>T. harzianum</i> -2	52.93	37.68	2	1	8.12	13.23	83.76	74.62
4. <i>T. viride</i> -1	20.43	15.08	2	2	28.45	24.89	43.10	52.24
5. <i>T. viride</i> -2	34.40	38.73	1	1	15.34	18.78	69.32	63.97
6. <i>T. hamatum</i>	16.75	31.93	5	5	30.67	11.67	38.66	77.61
7. <i>T. longibrachium</i>	43.58	17.40	5	5	20.00	29.00	60.00	44.36
8. <i>T. koningii</i>	15.00	43.50	2	2	29.89	26.00	40.22	50.11
9. <i>T. pseudokoningii</i>	17.33	18.08	2	3	28.89	38.00	42.22	27.10
10. Control / Témoin	**	**	**	**	50.00	52.12	**	**
SE ±	2.02	2.01	**	**	0.20	0.80	**	**
Intervalle de confiance								
CD at 5%	5.90	5.86	**	**	0.58	2.38	**	**

C. g = *C. gloeosporioides*. P. d = *P. disseminata*

Table II. Effect of metabolites of biocontrol agents on spore production and germination of *C. gloeosporioides* and *P. disseminata*.

*Tableau II. Effet des métabolites des agents de lutte biologique sur la production de spores et la germination de *C. gloeosporioides* et *P. disseminata*.*

Sl No.	Bio-control agents	Spore production				Spore germination			
		Av. no. of spores/ micro. field*		% inhibition over control		% germination		% inhibition over control	
		C. g	P. d	C. g	P. d	C. g	P. d	C. g	P. d
		Production des spores				Germination des spores			
N° de série	Agent de lutte biologique	Nb. moyen de spores / champ *		% d'inhibition sur les témoins		% de germination		% d'inhibition sur les témoins	
		C. g	P. d	C. g	P. d	C. g	P. d	C. g	P. d
1.	<i>Gliocladium virens</i>	162	229	45.27	27.99	41.10	44.30	53.97	36.71
2.	<i>Trichoderma harzianum</i> -1	107	71	63.85	77.67	26.34	13.50	70.50	80.71
3.	<i>T. harzianum</i> -2	71	96	76.06	69.81	18.71	18.20	79.04	74.00
4.	<i>T. viride</i> -1	187	234	36.82	26.41	47.69	47.60	46.59	32.00
5.	<i>T. viride</i> -2	99	88	66.55	72.33	18.75	15.10	79.00	78.43
6.	<i>T. hamatum</i>	190	131	35.81	58.80	53.57	26.18	40.00	62.60
7.	<i>T. longibrachiatum</i>	124	212	58.11	33.33	31.25	37.10	65.00	47.00
8.	<i>T. koningii</i>	213	82	28.04	74.21	58.04	12.05	35.00	82.78
9.	<i>T. pseudokoningii</i>	230	220	22.30	30.82	62.50	42.00	30.00	40.00
10.	Control / Témoin	296	318	..	..	89.29	70.00	..	..
SE ±		1.26	1.15			0.06	0.05		
Intervalle de confiance									
CD at 5%		3.75	3.40			0.17	0.16		

*Under 45 x 10 magnification/ Sous un grossissement de 45 x 10.

P. d = *P. disseminata*.

C. g = *C. gloeosporioides*

In case of *P. disseminata*, the percentage decrease in spore production varied from 26.41 to 77.67. Maximum inhibition was obtained using the metabolites of *T. harzianum*-1 followed by *T. koningii* (74.21%) and *T. viride*-2 (72.33%). *G. virens* was the least effective inhibiting the spore production only up to 27.99%.

Metabolites of all the biocontrol agents were also effective in varying degrees to inhibit the spore germination of the test pathogens. In case of *C. gloeosporioides*, the percentage inhibition in spore germination varied from 30.00 to 79.04. Metabolites of *T. harzianum*-2 and *T. viride*-2 were highly effective in inhibiting the spore germination. This was followed by *T. harzianum*-1 (70.5%) and *T. longibrachiatum* (65.0%). *T. pseudokoningii* was the least effective.

In case of *P. disseminata*, maximum inhibition in spore germination was obtained using the metabolites of *T. koningii* (82.78%), followed by *T. harzianum*-1 (80.71%), *T. viride*-2 (78.43%) and *T. harzianum*-2 (74%). Metabolites of *T. viride*-1 were the least effective, inhibiting the spore germination only up to 32.0%.

DISCUSSION

The awareness about the deleterious effects of chemical pesticides has led to extensive studies on the use of antagonistic microorganisms to manage plant diseases (Papavizas 1985, Lifshitz *et al.*, 1986). Though *Trichoderma* species are well-known antagonists in the soil, their ability to interact with pathogens by exhibiting competition, antibiosis and hyper-parasitism makes them attractive and effective for use on foliage too (Blakeman and Fokkema, 1982; Fokkema, 1993).

The mechanism involved in the suppression of growth of pathogenic fungi by *Trichoderma* has been explained by many workers. *Trichoderma* spp. restrict the development of other fungi by hyphal interaction involving coiling and penetration as well as by producing toxic metabolites. (Sivan and Chet, 1989; Mukhopadhyay, 1987; Lifshitz *et al.*, 1986).

In the present study, the antagonistic potential of eight isolates of *Trichoderma* and an isolate of *G. virens* was tested against two fungi that cause diseases on mulberry leaves in India. In general, *T. harzianum* isolates 1 and 2 and *T. viride* isolate 2 have shown high antagonism against both pathogens by suppressing their mycelial growth, spore production and spore germination. These antagonists have suppressed the growth of the above pathogens through mycelial as well as metabolite interactions, indicating mycoparasitism or a "toxin-mycoparasitism" synergistic effect (Lifshitz *et al.*, 1986). Though there is a slight difference in result between dual culture and agar plug methods, it can be seen that in case of best antagonists the result is either the same or the difference is very narrow.

Blakeman and Fokkema, (1982) remarked that successful biological control on aerial plant surfaces will depend not only on effectiveness, but also on a competitive cost with conventional fungicides and a lack of side effects of applied organisms, such as toxicity to humans, insects, animals etc. Hence, further studies are envisaged to confirm the effectiveness of above antagonists through field trials.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to the Director, CSRTI, Mysore for providing facilities for the study and to Mrs. Kshama Giridhar for statistical analysis of the data.

REFERENCES

- AGRIOS G. N. (1978) Plant Pathology (II Edn.) Academic Press, London.
 BELL D. K., WELLS H. D. & MARKHAM C. R. (1982) *In vitro* antagonisms of *Trichoderma* species against fungal plant pathogen. *Phytopathology*, 72(4): 379-382.

- BLAKEMAN J. P. and FOKKEMA N. J. (1982) Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane, *Ann. Rev. phytopathol.* 20: 167-192.
- BRIAN P. W. (1960) "Griseotulvin". *Trans. Br. Mycol. Soc.* 43: 1-13.
- FOKKEMA N. J. (1993) Opportunities and problems of control of foliar pathogens with microorganisms. *Pestic. Sci.* 37: 411-416.
- LIFSHITZ R., WINDHAM M. T. and BAKER R. (1986) Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* Spp. *Phytopathology*. 76(7): 720-725.
- LINDOW S. E. (1985) Foliar antagonists: Status and prospects. In: *Biological control in agricultural IPM systems* (eds) Hoy M. A. and Henzogog D. C. Academic Press, INC, London.
- MUKHOPADHYAY A. N. (1987) Biological control of soil-borne diseases of vegetables and pulses by *Trichoderma* spp. *Indian Phytopathology*. 40: 276-277.
- PAPAVIZAS G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. of Phytopathol.* 23: 23-54.
- SHARVELLE E. C. (1961) The nature and use of modern fungicides. Burges Publishing Co. Minn., USA pp. 308.
- SHIVAPRATAP H. R., TOMY PHILIP & SHARMA D. D. (1996) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against mulberry leaf spot pathogen, *Cercospora moricola*. *Indian J. Seric.* 35 (2). 107-110.
- SIDDARAMAIAH A. L. and PRASAD K. S. K. (1978) Laboratory evaluation of fungicides against *Cercospora moricola*. *Indian J. Seric.* 17: 44-47.
- SIVAN A. & CHET I. (1989) The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *F. oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*. 79: 198-200.
- TAKAHASHI S., YUAKOYOSHIDA, SHOICHIAMANA, MICHIC K., SHIGEHARU I., & TARO N. (1979) Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture (I). Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain, S. F., 1993. *Journal of Antibiotics*. 32: 427-436;
- VINCENT J. M. (1947) Distortion of fungal hyphae in presence of certain inhibitors. *Nature*. 96: 596.
- WAKSMAN S. A. (1927) Principles of soil microbiology. Baltimore Williams and Wilkins W., USA.

EFFET ANTAGONISTE DE *TRICHODERMA* ET DE *GLIOCLADIUM VIRENS* VIS À VIS DE DEUX PATHOGENES FOLIAIRES DU MURIER

T. PHILIP*, D. D. SHARMA & H.R. SHIVAPRATAP

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

Nous avons testé *in vitro* le potentiel antagoniste de huit isolats de *Trichoderma* et d'un isolat de *Gliocladium virens* vis à vis de *Colletotrichum gloeosporioides* et de *Pestalotiopsis disseminata*. Les études comprennent l'interaction entre les agents de lutte biologique au niveau mycélien et métabolite et les pathogènes. En général, *T. harzianum*-1 et 2 et *T. viride*-2 présentent un antagonisme élevé vis à vis de *C. gloeosporioides* et de *P. disseminata* et inhibent leur croissance mycélienne, leur production de spores et la germination des spores. *T. harzianum*-1 et 2 induisent l'inhibition maximum de la croissance mycélienne (50 et 53 mm respectivement) chez *P. disseminata* et *C. gloeosporioides*. De même, les filtrats de culture de ces antagonistes inhibent la croissance mycélienne de ces pathogènes d'environ 84 % et la production et la germination des spores de plus de 70 %. Les mécanismes d'antagonisme chez ces agents de lutte biologique s'avèrent être l'hyperparasitisme et l'antibiose.

INTRODUCTION

On a accordé une attention considérable au cours des deux dernières décennies à la lutte contre les maladies des plantes avec des moyens biologiques (Papavizas, 1985 ; Mukhopadhyay, 1987). La lutte biologique utilisant des espèces de *Trichoderma* contre les maladies des plantes est beaucoup plus efficace contre les maladies naissant dans le sol, cependant, ces espèces sont aussi intéressantes sur le feuillage grâce à leur capacité à interagir avec les pathogènes par la concurrence, l'antibiose et l'hyperparasitisme (Lindow, 1985 ; Blakeman et Fokkema, 1982). De nombreux pathogènes foliaires résistent de plus en plus aux fongicides et les produits chimiques présentent des risques pour l'environnement d'où l'intérêt pour une alternative non toxique dans la lutte contre les maladies foliaires (Fokkema, 1993). On a rapporté que chez le mûrier les fongicides chimiques ont une toxicité résiduelle envers les vers à soie même 15 jours après l'arrêt du traitement (Siddaramaiah et Prasad, 1978). On considère généralement que la lutte biologique est sûre, bon marché et ne nuit pas à l'environnement. Shivapratap et coll. (1996) ont montré que les isolats de *T. harzianum* et *T. viride* sont très antagonistes de la croissance mycélienne, de la production de spores et de la germination de spores de *Cercospora moricola*. Dans notre étude, neuf isolats de *Trichoderma* appartenant à cinq espèces et un isolat de *Gliocladium virens* ont été évalués *in vitro* contre *Colletotrichum gloeosporioides* et *Pestalotiopsis disseminata* responsables respectivement de la tache noire de la feuille et de l'anthracnose du mûrier.

* Central Sericultural Research & Training Institute - Research Extension Centre, Kidangoor Post, Angamaly - 683 572, Ernakulam, Kerala; Inde.

MATERIELS ET METHODES

Isolement des pathogènes et des agents de lutte biologique :

Les feuilles infestées par *C. gloeosporioides* et *P. disseminata* ont été recueillies respectivement à Mysore et à Kasargode et les pathogènes ont été isolés en suivant les méthodes standard (Agrios, 1978).

T. harzianum-1 et 2 sont isolés dans les sols de mûraies au *Central Sericultural Research and Training Institute*, Mysore, Inde par la technique de dilutions du sol sur plaques (Waksman, 1927). Le reste des isolats est recueilli à l'Université Agricole de Tamil Nadu, Coimbatore et à l'Institut de Recherche Agricole (IARI), New Delhi. Les cultures pures de tous les pathogènes et des antagonistes sont maintenues sur une gélose de dextrose de pomme de terre (PDA).

Interaction entre les agents de lutte biologique et les pathogènes :

L'interaction entre les agents de lutte biologique et *C. gloeosporioides* et *P. disseminata* a été étudiée sur milieu PDA (Takahashi et coll., 1979) par les méthodes de tampon gélosé et de culture couplée (Bell et coll., 1982).

a. Méthode de tampon gélosé :

La suspension de spores de pathogènes dans de l'eau distillée stérilisée, obtenue à partir de cultures de 7 jours est mélangée avec du PDA et versée dans des boîtes Petri de 10 cm de diamètre. Un disque de 4 mm d'antagonistes cultivés sur PDA est découpé à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé et posé au centre de la boîte et l'ensemble est incubé à $28 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 7 jours. Chaque traitement est répété trois fois. Le 7ème jour, la zone d'inhibition est mesurée comme la distance nette entre la périphérie du tampon gélosé et la croissance moyenne des pathogènes mesurée de trois angles différents. Les données ont été soumises à ANOVA.

b. Méthode de culture couplée :

On découpe un tampon de 4 mm des pathogènes et des antagonistes testés, à partir du bord des colonies en expansion sur le milieu à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé. Les isolats de couples d'antagonistes et de pathogènes sont placés en opposition à 5 cm l'un de l'autre dans une boîte Petri de 10 cm, contenant environ 20 ml de PDA. Les couples de cultures sont incubés à $28 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 5-7 jours et classés en fonction de leur degré d'antagonisme sur une échelle de 1 à 5 (Bell et coll., 1982) :

Classement 1 : L'agent de lutte biologique a complètement envahi le pathogène et recouvre la surface entière du milieu - très antagoniste.

Classement 2 : L'agent de lutte biologique a envahi au moins deux tiers de la surface du milieu - antagoniste.

Classement 3 : L'agent de lutte biologique et le pathogène ont chacun colonisé approximativement une moitié de la surface du milieu et aucun organisme n'apparaît dominer l'autre - modérément antagoniste.

Classement 4 : Le pathogène a colonisé au moins deux tiers de la surface du milieu et apparaît résister à l'empiètement par l'agent biologique - peu antagoniste.

Classement 5 : Le pathogène envahit complètement l'agent de lutte biologique et occupe la surface entière du milieu - non antagoniste.

Effet du filtrat de culture (métabolites) d'agents de lutte biologiques sur la croissance des pathogènes :

L'effet du filtrat de culture (métabolites) d'antagonistes sur la croissance *in vitro* de pathogènes a été étudié par empoisonnement de la nourriture (Sharvelle, 1961). Les métabolites d'agents de lutte biologique sont obtenus en les faisant pousser dans un bouillon de dextrose de pomme de terre pendant

10 jours et en filtrant la culture à travers un filtre papier Whatman No. 42 et en effectuant des centrifugations répétées à 9000 tours /mm. Les pathogènes poussent sur un milieu modifié avec 20 % de métabolites. Le pathogène dans le milieu sans filtrat sert de témoin. Chaque traitement et témoin sont répétés trois fois. Les boîtes sont incubées à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 7 jours. La croissance du pathogène dans le milieu influencé par le filtrat de culture d'agents de lutte biologique est mesurée le 7ème jour et comparée à celle du témoin.

Effet du filtrat de culture d'agents de lutte biologique sur la production de spores et la germination de spores des pathogènes :

Un disque mycélien de pathogènes de 4mm est découpé au hasard à différents endroits et mis à macérer dans 1 ml d'eau distillée pour libérer les spores dans les lots expérimentaux décrits ci-dessus.. Le nombre moyen de spores par ml de suspension de spore est compté grâce à 30 observations d'un champ microscopique ($\times 450$) des lots traités et témoins pour déterminer l'inhibition de la production de spores. L'effet des métabolites sur la germination des spores des pathogènes est étudié d'après la méthode des gouttes pendantes (Brain, 1960). Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne, de la production de spores et de la germination sont calculés d'après la formule de Vincent (1947).

RESULTATS

Interaction entre les agents de lutte biologique et les pathogènes :

a. Méthode de tampon gélifié :

Les agents de lutte biologique produisent une zone d'inhibition comprise entre 15,0 et 52,93 mm contre *C. gloeosporioides* et entre 15,08 et 50,00 mm contre *P. disseminata* (Tableau I).

L'isolat 2 de *T. harzianum* produit l'inhibition maximum contre *C. gloeosporioides* suivi par l'isolat 1 de *T. harzianum* (45,90 mm) et *T. longibrachiatum* (43,58 mm). *T. noningii* est le moins efficace contre *C. gloeosporioides*. En général, tous les isolats testés montrent une inhibition faible à forte contre *C. gloeosporioides*.

Dans le cas de *P. disseminata*, l'inhibition maximum est obtenue avec l'isolat-1 de *T. harzianum* (50 mm) suivi par *T. koningii* (43,50 mm), l'isolat-2 de *T. viride* (38,73 mm) et l'isolat -2 de *T. harzianum* (37,68 mm). L'isolat-1 de *T. viride* est le moins efficace en développant une zone faible de 15,08 mm.

b. Méthode de culture couplée :

Seul *T. viride*-2 montre un antagonisme élevé contre *C. gloeosporioides*, tandis que les isolats 1 et 2 de *T. harzianum*, l'isolat-1 de *T. viride*, *T. koningii* et *T. pseudokoningii* appartiennent au groupe des antagonistes. *G. virens* est un antagoniste faible tandis que *T. hamatum* et *T. longibrachiatum* ne sont pas antagonistes.

Dans le cas de *P. disseminata*, *T. viride*-2 et *T. harzianum*-2 montrent un antagonisme élevé. *T. harzianum*-1, *T. viride*-1 et *T. koningii* sont antagonistes. *G. virens* est modérément antagoniste, tandis que *T. longibrachiatum* et *T. Hamatum* ne sont pas antagonistes.

Parmi tous les antagonistes testés, *T. viride*-2 fait preuve d'un antagonisme élevé contre les deux pathogènes dans la méthode de culture couplée (Tableau I).

Effet des métabolites des antagonistes sur la croissance mycélienne des pathogènes :

Les métabolites de tous les agents biologiques testés inhibent la croissance du pathogène à des degrés variés. Dans le cas de *C. gloeosporioides*, le pourcentage d'inhibition varie de 38,66 à 83,76. L'inhibition maximum est produite par le métabolite de *T. harzianum*-2 suivie par celle de *T. viride*-2 (69,32 %), *T. harzianum*-1 (62,22 %) et *G. virens* (61,96 %). *T. hamatum* est le moins efficace.

Dans le cas de *P. disseminata*, le pourcentage d'inhibition varie entre 27,10 et 84,00. L'inhibition maximum est produite par les métabolites de *T. harzianum*-1, suivie par *T. hamatum* (77,61 %) et *T. harzianum*-2 (74,62 %). Les métabolites de *T. pseudokoningii* sont les moins inhibiteurs. En général, les métabolites de tous les agents de lutte biologique sont comparativement plus efficaces pour inhiber la croissance de *C. gloeosporioides* que celle de *P. disseminata* (Tableau I).

Effet des métabolites sur la production de spores et la germination des pathogènes :

Les métabolites de tous les agents de lutte biologique font baisser la production de spores dans le milieu des deux pathogènes testés (Tableau II). La baisse de production de spores chez *C. gloeosporioides* varie de 22,3 % à 76,06 %. La baisse maximum est obtenue en utilisant les métabolites de *T. harzianum*-2, suivis par *T. viride*-2 (66,55 %). Le moins efficace est *T. pseudokoningii*.

Dans le cas de *P. disseminata*, la baisse de production de spores varie entre 26,41 et 77,67 %.

L'inhibition maximum est obtenue en utilisant les métabolites de *T. harzianum*-1 suivi par *T. koningii* (74,21 %) et *T. viride*-2 (72,33 %). *G. virens* est le moins efficace pour inhiber la production de spores (27,99 %).

Les métabolites de tous les agents biologiques sont également efficaces à des degrés variés pour inhiber la germination des spores des pathogènes testés. Dans le cas de *C. gloeosporioides*, le pourcentage d'inhibition de la germination des spores varie entre 30,00 et 79,04. Les métabolites de *T. harzianum*-2 et *T. viride*-2 sont très efficaces pour inhiber la germination des spores. Ils sont suivis par *T. harzianum*-1 (70,5%) et *T. longibrachiatum* (65,0 %). *T. pseudokoningii* est le moins efficace.

Dans le cas de *P. disseminata*, l'inhibition maximale de la germination des spores est obtenue en utilisant les métabolites de *T. koningii* (82,78 %), suivi par *T. harzianum*-1 (80,71 %), *T. viride*-2 (78,43 %) et *T. harzianum*-2 (74 %). Les métabolites de *T. viride*-1 sont les moins efficaces et n'inhibent la germination des spores que de 32,0 %.

DISCUSSION

La prise de conscience par rapport aux effets nocifs des pesticides chimiques a donné lieu à de vastes études sur l'utilisation des micro-organismes antagonistes pour lutter contre les maladies des plantes (Papavizas 1985. Lifshitz et coll., 1986). Bien que les espèces de *Trichoderma* soient des antagonistes bien connus à l'intérieur du sol, leur capacité à interagir avec les pathogènes, en étant en concurrence, et grâce à leur antibiose et à leur hyper parasitisme les rend intéressantes pour les utiliser aussi sur le feuillage (Blakeman et Fokkema, 1982 ; Fokkema, 1993).

Le mécanisme impliqué dans la suppression par *Trichoderma* de la croissance des champignons pathogènes a été expliqué par de nombreux chercheurs. *Trichoderma* spp. restreint le développement des autres champignons par une interaction hyphale, qui comprend l'enroulement et la pénétration et également par la production de métabolites toxiques (Sivan et Chet, 1999 ; Mukhopadhyay, 1987 ; Lifshitz et coll., 1986).

Dans l'étude présente, le potentiel antagoniste de huit isolats de *Trichoderma* et d'un isolat de *G. virens* a été testé contre deux champignons responsables de maladies sur les feuilles de mûrier en Inde. En général les isolats 1 et 2 de *T. harzianum* et l'isolat-2 de *T. viride* font preuve d'un antagonisme élevé contre les deux pathogènes, en supprimant leur croissance mycélienne, leur production de spores et leur germination de spores. Ces antagonistes suppriment la croissance des pathogènes en question grâce à des interactions mycélienne et des métabolites, ce qui indique un mycoparasitisme ou un effet synergique « mycoparasitisme - toxines » (Lifshitz et coll, 1986). Bien qu'il y ait une légère différence de résultats entre les méthodes de cultures couplées et de tampons gélifiés, on observe que pour les meilleurs antagonistes le résultat est soit le même soit la différence est très faible.

Blakeman et Fokkema (1982) ont observé que le succès de la lutte biologique sur les parties aériennes des plantes sera assuré non seulement par son efficacité mais aussi grâce à son coût

compétitif par rapport aux fongicides conventionnels et grâce à l'absence d'effets secondaires sur d'autres organismes, comme la toxicité envers les humains, les insectes et les animaux, etc... Dans cette optique, on envisage d'entreprendre des études supplémentaires pour confirmer l'efficacité de ces antagonistes grâce à des essais sur le terrain.

SYMPTOMATOLOGICAL OBSERVATIONS ON MANGANESE DEFICIENCY IN MULBERRY (*MORUS INDICA* L. VARIETY M5)

M.S. MANJUNATH, U.D. BONGALE* AND S.B. DANDIN

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore - 560 062, India.

*Pot culture studies were conducted using quartz sand with Hoagland's nutrient medium with a total of eight harvests taken, using M5 variety of *Morus indica* L. Details of symptomatological observations on manganese deficiency along with the data on growth and yield, mineral elemental composition, and protein, sugar and chlorophyll contents of leaves were recorded. Prominent symptoms included the initiation of chlorosis as interveinal light yellowish green patches on the younger leaf in the initial stages which progressed downwards on the shoots with increased leaf maturity. Development of interveinal chlorotic lesions represented moderate stage of the symptoms, while the development of necrotic spots, chlorotic patches and withering of the leaves represented acute stage of manganese deficiency. Details of observations are discussed in comparison with those recorded in other crop species as also with those recorded in mulberry from farmers' fields.*

Keywords: Manganese, *Morus*, mulberry, nutrient deficiency, plant nutrients, symptomatology.

INTRODUCTION

Manganese, one of the essential plant micronutrient elements, is known to activate a number of enzymes in plant metabolism, and is involved in nitrogen metabolism (Tandon, 1991). Mulberry exhibits nutrient deficiencies as chlorosis under intensive cultivation (Bongale, 1995). Among a number of deficiencies noticed under field conditions, chlorosis owing to Mn and S deficiencies associated with poor performances of silkworm cocoon crops are recorded from red soil areas of intensive sericulture in Kolar and Bangalore districts (Bongale *et al.*, 1996). Symptomatological observations under manganese stress conditions are widely reported from a number of agricultural and horticultural crops (Chapman, 1975; Singh and Subbarao, 1995; Mengel and Kirkby, 1987; Tandon, 1991). However, similar information is not available with regard to mulberry except those with field observations (Bongale, 1994). Present study was undertaken with a view to record the symptomatology for diagnostic purposes.

MATERIALS AND METHODS

A pot culture study was conducted in two batches during 1995-97 using quartz sand (2 mm mesh size) in thermocoal containers and in battery containers respectively. The treatments i.e., Hoagland's nutrient media of original concentration and Hoagland's nutrient media deleting manganese (Hoagland and Arnon, 1950) were replicated ten times with one plant per pot. Sixty day old saplings raised in quartz sand with deionised water, were transplanted into the experimental pots and the

* For correspondence.

treatments were imposed by adding 100 ml of Hoagland's nutrient media every alternate day allowing excess medium to leach out through a pair of holes at 2 cm above the base of the pots. Three and five harvests in batch I and batch II respectively, were taken at an interval of sixty days each. Growth and yield observations were recorded for each harvest. Symptomatology observations were recorded periodically depending on the development of the deficiency. Leaf samples dried at 60°C and powdered were analysed for Mn, Zn, Fe and Cu using di-acid digested samples with the Atomic Absorption Spectrophotometer, and for N, P, K, Ca, Mg and S (Jackson, 1973), soluble proteins (Lowry *et al.*, 1951), sugar (Dubois *et al.*, 1956) and chlorophyll (Arnon, 1949) contents. Symptomatology observations from the eight harvests were consolidated, while the data on three harvests of batch I were pooled and subjected to statistical analysis in respect of the treatment differences (Sunder Raj *et al.*, 1972).

RESULTS

Height of the longest shoots significantly decreased in manganese stress condition (15.70 cm) compared to the check (17.55 cm), while the treatments did not differ significantly in respect of the number of shoots per plant, total number of leaves per plant, internodal distance and leaf yield (Table I). Similarly there was no significant difference in the N, P, K, Ca, Mg and S contents of the leaf between manganese stress condition and the control. The Mn and Cu contents differed significantly and decreased under Mn stress (34.66 and 8.44 ppm respectively) compared to the check (66.82 and 12.55 ppm respectively), while Zn and Fe contents did not differ significantly between the treatments. Chlorophyll-a and total chlorophyll contents reduced significantly (2.687 and 3.959 mg/g respectively) in manganese stress condition compared to the control (2.872 and 4.232 mg/g respectively), while chlorophyll-b, protein and sugar contents did not differ significantly between the treatments (Table II).

Visual symptoms of Manganese deficiency (Fig. 1):

Varied degrees of chlorosis could be noticed in mulberry plants under manganese stress during consecutive harvests, recording varied degrees during initial harvests followed by severe symptoms in the later harvests. The symptoms were recorded as follows.

Early stage:

Initially light yellowish polygonal patches appeared along the margins extending towards the midrib in 2nd and 3rd order leaf positions from the shoot tip. As the deficiency persisted, the patches increased in number, spread and coalesced forming large irregular areas leading to pale yellowish interveinal stripes. The young affected leaves exhibited a network of green veins on a yellowish green background. Sometimes during initial stages, the deficient leaves produced typical interveinal chlorosis with dark green spots along the major veins leading to a fine reticulate pattern (Fig. 1a).

Moderate stage:

With the progress of the development of symptoms, chlorotic spots at the interveinal regions coalesced and formed rows between the veins and the dark green areas became dull green. Varied degrees of discoloration (chlorosis) of such rows starting from greenish yellow to light yellow, to orange yellow, to yellowish white could be observed with increasing maturity of the leaf (interveinal chlorosis). Further intensification of symptoms lead downward curling of margins, and yellowing of entire leaf, while the veins retained pale green colour (Fig. 1b). As this progressed in 2nd and 3rd leaf, the next order leaf (4th and 5th) developed interveinal chlorotic lesions commencing from around the midrib (Fig. 1c). These developed in to clusters of lesions around the midrib, and later scattered towards the margin. These lesions (interveinal chlorosis) diffused and crossed the veins under severe deficiencies causing downward curling of margins, and the entire leaf becoming chlorotic (Fig. 1d).

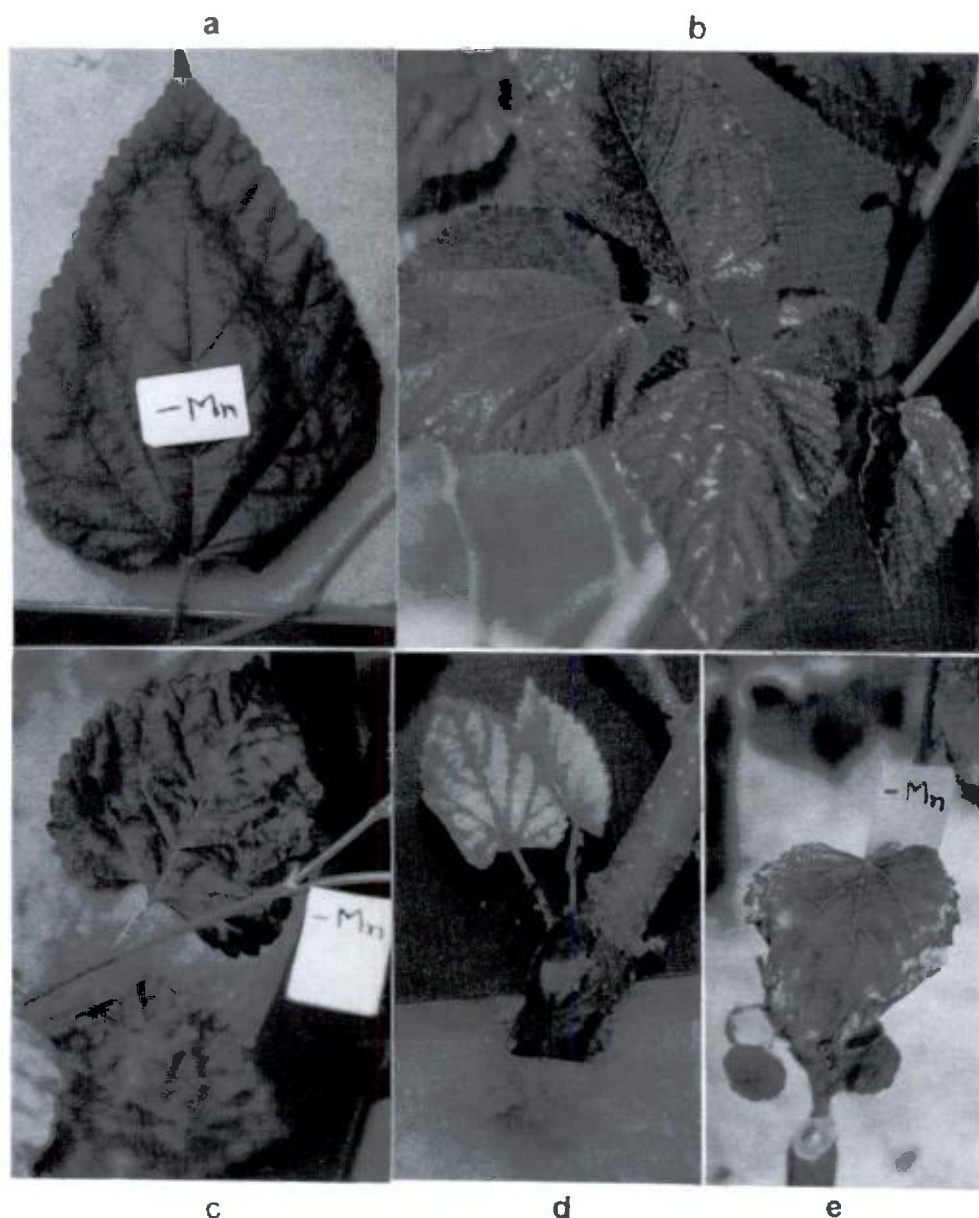


Fig. 1. Symptomatology of Mn deficiency in mulberry grown with Hoagland (-Mn) medium.

Fig. 1. Symptomatologie de l'insuffisance en Mn chez le mûrier cultivé sur un milieu de Hoagland (-Mn).

- a) Early stage: Initiation of chlorotic patches / Premier stade : Induction des plaques chlorotiques.
 b) Moderate stage: Interveinal chlorotic patches / Stade moyen : Plaques chlorotiques internervures.
 c) Moderate stage: Interveinal chlorotic lesions / Stade moyen : Lésions chlorotiques internervures.
 d) Later moderate stage: Entire leaf turns chlorotic / Stade moyen tardif : La feuille entière devient chlorotique.
 e) Acute stage: Marginal necrotic patches / Stade intense : Plaques marginales nécrotiques.

Table I. Growth and yield data of M5 variety under Mn stress condition.

Tableau I. Données concernant la croissance et le rendement chez la variété M5 en condition de stress en Mn.

Parameter	Check	-Mn	F test	CD at 5 %	CD at 1 %
Paramètre	Contrôle		Test F	Différence critique à 5 %	Différence critique à 1 %
Height of longest shoot (cm) <i>Hauteur du rameau le plus long (cm)</i>	17.55	15.70	S	1.390	1.940
Number of shoots / plant <i>Nombre de rameaux / plant</i>	3.74	3.32	NS	-	-
Total number of leaves / plant <i>Nombre total de feuilles / plant</i>	18	17	NS	-	-
Internodal distance (cm) <i>Distance internodale (cm)</i>	3.34	3.08	NS	-	-
Leaf yield (g/plant) <i>Rendement en feuilles (g/plant)</i>	19.55	18.18	NS	-	-

NS = Non Significant; S = Significant. NS : Non Significatif ; S : Significatif



Fig. 2. Healthy leaf of mulberry in control set for comparison with Fig. 1.

Fig. 2. Feuille de mûrier saine du groupe témoin pour comparaison avec la figure 1.

Table II. Biochemical composition of mulberry leaves under Mn stress condition.**Tableau II. Composition biochimique des feuilles de mûriers sous condition de stress en Mn.**

Parameters/Paramètres	Treatments/Traitements			
	Check / Vérification	Mn	F test Test F	CD at 5 % / Différence critique à 5 %
Nitrogen % / % d'azote	3.199	3.108	NS	-
Phosphorus % / % de phosphore	0.199	0.162	NS	-
Potassium % / % de potassium	3.213	3.450	NS	-
Calcium % / % de calcium	3.628	3.844	NS	-
Magnesium % / % de magnésium	0.406	0.520	NS	-
Sulphur % / % de soufre	0.533	0.578	NS	-
Zinc (ppm) / Zing (ppm)	43.30	43.22	NS	-
Iron (ppm) / Fer (ppm)	370.88	331.66	NS	-
Manganesec (ppm) / Manganèse (ppm)	66.82	34.66	S	8.101
Copper (ppm) / Cuivre (ppm)	12.55	8.44	S	3.926
Fe / Mn	5.55	9.57	-	-
Chlorophyll 'a' (mg/g) / Chlorophylle 'a' (mg/g)	2.872	2.687	S	0.175
Chlorophyll 'b' (mg/g) Chlorophylle 'b' (mg/g)	1.303	1.226	NS	-
Total chlorophyll (mg/g) Chlorophylle totale (mg/g)	4.232	3.959	S	0.270
Protein % / % de protéines	19.212	19.059	NS	-
Sugar % / % de sucres	7.424	8.015	NS	-

NS - Non significant; S - Significant.
 NS - Non significatif; S - Significatif.

Acute stage:

As the chlorosis became more severe, growth of the affected leaf became considerably reduced, associated with the development of orange yellow to reddish brown necrotic spots developing into necrotic patches in the interveinal and marginal areas. At the same time, marginal scorching commencing from tip towards the leaf base of the lamina lead to papery lamina and later the necrotic leaf withered off (Fig. 1c).

DISCUSSION

Observations recorded in the present study on the commencement of the symptoms from the youngest leaf on a shoot progressing downward with increasing leaf maturity, development of interveinal pale yellowish green chlorotic patches with a network of dark green veins and veinlets, necrotic spots leading to necrotic patches and withering of the entire leaf, reduction in the size of the leaf, and stunted growth are in accordance with similar symptoms recorded in a majority of plant species. However, these symptoms differ in various respects with the common symptoms recorded in a few other plant species observations on which are reviewed by Chapman (1975). Among these, the present symptoms differ from those in case of apple (*Malus* sp.) in the commencement of chlorosis, not from the margins, but from inner part of the lamina (between the veins); brown streaks as recorded in case of barley (*Hordeum vulgare*), however, were not recorded in the present study; and downward curling of the margins (during medium severity developing into necrosis in the present study) is in accordance with similar symptoms recorded in beet (*Beta vulgaris*). Rarely under medium to severe symptoms, the interveinal patches appeared orange yellow, and in such instances the chlorosis also appeared at the leaf margins and the leaf tip apart from developing interveinal chlorotic patches as a regular symptom resembling potassium deficiency in mulberry (Bongale, 1997). This is also in accordance with the manganese deficiency symptoms recorded in case of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum* varieties) (Bennet, 1993; Chapman, 1975). Commencement of the symptoms at the youngest fully emerged leaf recorded in the present study differs distinctly from the first appearance of symptoms in the middle (4th and 5th) leaves of about four week old plants in maize (Kanwar and Randhawa, 1974). Development of interveinal chlorotic patches spreading in to laminal lesions resembles those recorded elsewhere in case of magnesium deficiency in mulberry (Bongale, unpublished data). Mengel and Kirkby (1987) and Bennett (1993) also recorded the similarity between the magnesium and manganese deficiency in this respect and differentiated the two in respect of commencement of symptoms that appear in older (mature) leaf in case of magnesium, and in younger leaf in case of manganese in other crop species. In addition to this difference, the chlorotic lesions recorded in the present study were concentrated around the midrib and were pale yellowish green in colour, while those recorded elsewhere (Bongale, unpublished data) for magnesium were dark brown and distributed away from the midrib. In addition, the lesions in case of manganese deficiency were of irregular shape compared to longitudinal stripes in case of magnesium deficiency. The symptoms recorded in the present study also resemble those in respect of iron deficiency except that in the latter, the entire leaf (including the veins) turns chlorotic (Chapman, 1975).

The symptoms recorded from the instances of severe chlorosis noticed in some intensive areas of sericulture have been attributed to manganese and sulphur deficiencies (Bongale, 1994; 1995). Details of symptoms recorded therein are similar to those recorded in the present study. However, in those field observations, it was observed that in majority of the low to medium levels of severity, the plants recovered from chlorotic symptoms with the advanced growth stages of over 50 days. Such recoveries are attributed to the development of root system and the resultant solubilisation of manganese in the soil in the later stages of the growth (Bongale, 1995; Mengel and Kirkby, 1987). Such recoveries associated with the advanced growth stages, however, were not recorded in the present study possibly owing to the absence of manganese in the growth medium. The concentration of manganese of around 35 ppm in the leaf tissue from the deficient plants recorded in the present

study is also considerably higher compared to the critical levels of 10 to 20 ppm recorded in respect of a number of other crop species (Chapman, 1975; Tandon, 1995). These observations on the higher levels of manganese contents in mulberry leaves are also in accordance with the values recorded from the field samples from chlorotic gardens (Bongale *et al.*, 1996). The manganese deficiency symptoms are also attributed to the higher Fe/Mn values in the leaf as also in the soil (Bongale *et al.*, 1996; Iizuka, 1985). Similarly, in the present study, the Fe/Mn values of 5.5 and 9.5 were recorded in normal and deficient plants respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to the World Bank and the Central Silk Board, Bangalore, for financial assistance in the form of a project under which the present study was carried out.

REFERENCES

- ARNON D.N. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 15.
- BENNETT W.F. (1993) Nutrient deficiencies and toxicities in crop plants. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- BONGALE U.D. (1994) Manganese deficiency induced chlorosis in M5 mulberry and remedial measures. KSSR&DI Extension leaflet, 13: 6.
- BONGALE U.D. (1995) Chlorosis in mulberry and remedial measures. Indian Silk, 34(5): 34-37.
- BONGALE U.D., KRISHNA M., CHALUVACHARI (1996) Effect of multinutrient foliar spray on chlorosis in M5 variety of mulberry. Indian J. Seric., 35(1): 9-12.
- BONGALE U.D. (1997) Potassium deficiency symptoms in certain important varieties of mulberry (*Morus sp.*) under field plantations in Karnataka (India). Indian J. Seric., 36(1): 78-80.
- CHAPMAN H.D. (1975) Diagnostic criteria for plants and soils. Eurasia Publishing House (P) Ltd., New Delhi, India.
- DUBOIS M.K., GILLER K.A., HAMILTON K., RELERS P.A., SMITH F. (1965) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Annal. Chem., 28(2), 150-158.
- HOAGLAND D.R. AND ARNON D.I. (1950) Water culture method for growing plants without soil. California Agric. Expt. Stn. Cir - 347.
- IIZUKA T. (1985) Interaction between iron and manganese in mulberry plant nutrition. Bull. Seric. Expt. Stn. 30(1): 1-18.
- JACKSON M.L. (1973) Soil Chemical Analysis. Prentice Hall of India Ltd., New Delhi, India.
- KANWAR J.S., RANDHAWA N.S. (1974) Micronutrient research in soils and plants in India. ICAR Technical Bulletin (Agric.) No. 50: 62-87.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MENGEL K., KIRKBY E.A. (1987) Principles of plant nutrition (IV Edn.). International Potash Institute, Bern, Switzerland.
- SINGH M.V., SUBBARAO A. (1995) Micronutrient research and agricultural production. Edited by H.L.S. Tandon. Fertilizer Development and Consultation Organisation, New Delhi, India, pp. 83-114.
- SUNDER RAJ N., NAGARAJU S., VENKATARAMU M.N., JAGANNATH M.K. (1972) Design and analysis of field experiments. University of Agricultural Sciences, Bangalore, India.
- TANDON H.L.S. (1991) Secondary and micronutrients in agriculture - A guide book-cum-Directory. Fertilizer Development and Consultation Organisation, New Delhi, p. 122.
- TANDON H.L.S. (1995) Micronutrient research and agricultural production. Fertilizer Development and Consultation Organisation, New Delhi, pp. 84-85.

OBSERVATIONS DES SYMPTOMES ENGENDRES PAR UNE CARENCE EN MANGANESE CHEZ LE MURIER (*MORUS INDICA* L., VARIETE M5)

M.S. MANJUNATH, U.D. BONGALE & S.B. DANDIN

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

*Des cultures en pot ont été réalisées avec du sable et du milieu nutritif de Hoagland en utilisant la variété M5 de *Morus indica* L. L'étude a porté sur un total de huit récoltes. Nous avons enregistré les symptômes dus à la carence en manganèse et les données sur la croissance et le rendement, la composition en éléments minéraux et le contenu en protéines, sucres et chlorophylle des feuilles. Les symptômes principaux comprennent le début de chlorose signalé par des plaques vert jaune clair entre les nervures sur les feuilles les plus jeunes au stade initial, qui progressent sur les pousses du bas alors que les feuilles deviennent matures. Le développement de lésions chlorotiques entre les nervures fait partie des symptômes modérés tandis que le développement de taches nécrotiques, de plaques chlorotiques et du flétrissement des feuilles représente un stade aiguë de la carence en manganèse. Les détails observés sont discutés par comparaison avec ceux rapportés chez d'autres espèces de plantes et avec ceux observés dans des mûraies.*

INTRODUCTION

On sait que le manganèse, un des micro-éléments nutritifs essentiels à la plante, active certaines enzymes du métabolisme des plantes et est impliqué dans le métabolisme de l'azote (Tandon, 1991). Le mûrier quand il est cultivé de manière intensive présente des carences en nutriments tels que la chlorose (Bongale, 1995). Parmi certaines carences observées sur le terrain on a noté dans les zones à sol rouge de sériciculture intensive dans les régions de Kolar et Bangalore une chlorose due à des carences en Mn et en S qui entraîne de mauvaises performances de récoltes de vers à soie (Bongale et coll., 1996). Les symptômes en cas de carence en manganèse ont été observés chez de nombreuses cultures agricoles et horticoles (Chapman, 1975; Singh et Subbarao, 1995 ; Mengel et Kirkby, 1987 ; Tandon, 1991). Cependant, on ne dispose pas d'information similaire sur le mûrier, mis à part les observations sur le terrain (Bongale, 1994). L'étude présente a été entreprise dans le but d'enregistrer les symptômes à des fins de diagnostic.

MATERIELS ET METHODES

Une étude sur cultures en pots a été réalisée en 1995-97 avec deux lots en utilisant du sable de quartz (taille de tamis de 2 mm) dans des containers en charbon thermique et des containers à batterie. Les traitements, milieu nutritif de Hoagland à la concentration originelle et milieu nutritif de Hoagland sans manganèse (Hoagland et Arnon, 1950) sont répétés dix fois avec un plant par pot. Les plants de soixante jours cultivés dans du sable avec de l'eau déionisée, sont transplantés dans les pots d'expérimentation et les traitements sont réalisés en ajoutant 100 ml de milieu nutritif un jour sur deux et en laissant le milieu en trop s'écouler par deux trous de 2 cm au-dessus de la base des pots.

On obtient respectivement trois et cinq récoltes effectuées tous les soixante jours pour les lots I et II. Les observations concernant la croissance et le rendement ont été enregistrées pour chaque récolte. Les symptômes observés sont enregistrés périodiquement en fonction du développement de la carence. Des échantillons de feuilles séchées à 60° C et réduites en poudre ont été analysés en Mn, Zn, Fe et Cu en utilisant des échantillons digérés à l'acide avec un Spectrophotomètre d'Absorption Atomique. Pour l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et le soufre nous avons utilisé les méthodes de Jackson (1973), pour les protéines solubles la méthode de Lowry et coll. (1951), pour les sucres celle de Dubois et coll. (1956) et pour la chlorophylle celle de Arnon (1949). Les symptômes observés à partir des huit récoltes sont réunis, tandis que les données sur les trois récoltes du lot I sont regroupées et soumises à une analyse statistique par rapport aux différences de traitement (Sunder Raj et coll., 1972).

RESULTATS

La longueur des pousses les plus longues baisse de manière significative en cas de carence en manganèse (15,70 cm) par rapport au témoin (17,55 cm), tandis que le nombre de pousses par plant, le nombre total de feuilles par plant, la distance internodale et le rendement en feuilles ne diffèrent pas de manière significative en fonction des traitements (Tableau I). De même, il n'y a pas de différence significative de teneur en N, P, K, Ca, Mg et S de la feuille entre la condition de carence en manganèse et le témoin. Les teneurs en Mn et en Cu diffèrent de manière significative et baissent en cas de carence en Mn (34,66 et 8,44 ppm respectivement) comparées au témoin (66,82 et 12,55 ppm respectivement), tandis que les teneurs en Zn et en Fe ne diffèrent pas de manière significative entre les traitements. Les teneurs en chlorophylle-a et en chlorophylle totale baissent de manière significative (2,687 et 3,959 mg/g respectivement) en condition de carence en manganèse par rapport au témoin (2,872 et 4,232 mg/g respectivement) tandis que les teneurs en chlorophylle-b, en protéines et en sucres ne diffèrent pas de manière significative entre les traitements (Tableau II).

Symptômes visuels de la carence en manganèse (Fig. 1) :

Des degrés variés de chlorose peuvent être observés chez les plants de mûrier carencés en manganèse au cours des récoltes successives, avec des degrés variés pour les récoltes initiales suivis par des symptômes sévères pendant les récoltes suivantes. Les symptômes enregistrés sont les suivants :

Stade initial :

Au début des plaques polygonales jaune clair apparaissent le long des bords et s'étendent vers la nervure principale au niveau de la 2ème et de la 3ème feuille à partir du sommet de la pousse. Alors que la carence persiste, les plaques augmentent en nombre, en taille et se fondent pour former des zones larges irrégulières jusqu'à devenir des rayures jaune pâle entre les nervures. Les jeunes feuilles touchées présentent un réseau de nervures vertes sur fond jaune vert. Parfois, aux premiers stades, les feuilles carencées produisent une chlorose typique entre les nervures avec des taches vert foncé le long des nervures principales jusqu'à former un dessin sur toute la surface (Fig 1a).

Stade modéré :

Avec le développement des symptômes, les taches chlorotiques dans les zones entre les nervures se fondent et forment des lignes entre les nervures et les zones vert sombre deviennent vert pâle. Des degrés variés de décoloration (chlorose) atteignent ces lignes allant d'un jaune verdâtre, jaune clair jusqu'à un jaune orangé et à un blanc jaunâtre au fur et à mesure de la maturation de la feuille (chlorose entre les nervures). L'intensification supplémentaire des symptômes entraîne le recroquevillement des bords de la feuille vers le bas, et le jaunissement de la feuille entière, tandis que les nervures restent vert pâle (Fig 1b). Lorsque les 2ème et 3ème feuilles sont à ce stade, les feuilles suivantes (4ème et

5ème) sont touchées par des lésions chlorotiques entre les nervures commençant autour de la nervure principale (Fig. 1c). Ces lésions s'agglutinent autour de la nervure principale, et plus tard atteignent le bord. Ces lésions (chlorose entre les nervures) s'étendent et traversent les nervures quand les carences sont importantes, cela entraîne le recroquevillement des bords des feuilles vers le bas et la feuille entière devient chlorotique (Fig. 1d).

Stade avancé :

Alors que la chlorose devient plus grave, la croissance des feuilles touchées diminue de manière considérable et coïncide avec le développement de taches nécrotiques allant du jaune orangé au marron rouge qui se transforment en plaques nécrotiques dans les zones entre les nervures et sur les bords. Au même moment, la feuille roussit légèrement à partir du sommet jusqu'aux limbes à la base de la feuille, ce qui a pour effet de rendre les limbes minces comme du papier et entraîne plus tard le dessèchement de la feuille nécrotique.

DISCUSSION

Les observations enregistrées dans notre étude : des symptômes qui commencent sur les feuilles les plus jeunes de la pousse et progressent vers le bas au fur et à mesure de la maturation de la feuille, le développement de plaques chlorotiques d'un jaune vert pâle entre les nervures, le réseau de nervures et de veinules, les taches nécrotiques qui entraînent des plaques nécrotiques et le flétrissement de toute la feuille, la diminution de la taille de la feuille et la croissance avortée confirment des symptômes similaires observés chez une majorité d'espèces. Cependant, ces symptômes diffèrent à plusieurs égards des symptômes courants enregistrés chez certaines espèces de plantes qui ont été présentés par Chapman (1975). Les symptômes de cette étude diffèrent entre autres de ceux du pommier (*Malus* sp) chez qui la chlorose commence, non pas au bord, mais à l'intérieur des limbes (entre les nervures). Dans le cas de l'orge (*Hordeum vulgare*) des bandes marron apparaissent, qui n'ont pas été observées dans cette étude. Le recroquevillement des bords (en cas d'atteinte moyenne qui dérive vers la nécrose dans cette étude) ressemble aux symptômes enregistrés chez la betterave (*Beta vulgaris*). Dans le cas de symptômes moyens à sévères, il est rare que les plaques entre les nervures soient jaune orangé, et dans de tels cas la chlorose apparaît aussi aux bords de la feuille et au sommet de la feuille sauf lorsque les plaques chlorotiques entre les nervures se développent comme un symptôme régulier dû à une carence en potassium chez le mûrier (Bongale, 1997). Cela ressemble aux symptômes de carence en manganèse chez *Chrysanthemum* (Bennet, 1993 ; Chapman, 1975). Le début des symptômes sur les feuilles les plus jeunes, bien développées, tel qu'il a été observé dans notre étude diffère distinctement du maïs où chez des plants de quatre semaines la première apparition des symptômes se produit sur les feuilles du milieu (4ème et 5ème) (Kanwar et Randhawa, 1974). Le développement de plaques chlorotiques entre les nervures qui s'étendent jusqu'aux limbes, ressemble à celui enregistré dans le cas de carence en magnésium chez le mûrier (Bongale, données non publiées). Mengel et Kirkby (1987) et Bennett (1993) ont aussi observé une similarité entre la carence en magnésium et en manganèse à cet égard et différencient les deux chez d'autres espèces de plantes parce que les symptômes apparaissent en premier chez les feuilles les plus vieilles (matures) dans le cas du magnésium et chez les feuilles les plus jeunes dans le cas du manganèse. En plus de cette différence, les lésions chlorotiques enregistrées dans notre étude se concentrent autour de la nervure médiane et sont d'un vert jaune pâle, tandis que pour le magnésium (Bongale, données non publiées) elles sont marron foncé et distribuées loin de la nervure principale. De plus, les lésions dans le cas de carence en manganèse sont de forme irrégulière comparées aux rayures longitudinales dans le cas d'une carence en magnésium. Les symptômes enregistrés dans cette étude ressemblent aussi à ceux liés à une carence en fer si ce n'est que dans ce dernier cas, la feuille entière (y compris les nervures) devient chlorotique (Chapman, 1975).

Les cas de chlorose sévères enregistrés dans des zones de sériciculture intensive sont attribués à des carence en manganèse et en soufre (Bongale, 1994 ; 1995). Les symptômes enregistrés dans ce cas sont similaires à ceux enregistrés dans l'étude actuelle. Cependant, dans ces observations sur le terrain, on a observé que dans la majorité des cas de sévérité faible à moyenne, les plantes se sont remises des symptômes chlorotiques aux stades de croissance avancée, à plus de 50 jours. De telles guérisons sont attribuées au développement du système racinaire et à la solubilisation du manganèse dans le sol qui s'ensuit aux dernier stades de la croissance (Bongale, 1995 ; Mengel et Kirkby, 1987). De telles guérisons aux stades de croissance avancée, cependant, n'ont pas été enregistrées dans notre étude, sûrement à cause de l'absence de manganèse dans le milieu de croissance. La concentration en manganèse enregistrée dans cette étude dans le tissu foliaire de plantes carencées est autour de 35 ppm et est bien plus élevée que celles des niveaux critiques de 10 à 20 ppm enregistrés chez certaines autres espèces (Chapman, 1975 ; Tandon, 1995). Ces observations de niveaux plus élevés en manganèse dans les feuilles de mûrier confirment les valeurs mesurées sur le terrain dans des plantations chlorotiques (Bongale et coll., 1996). Les symptômes de carence en manganèse sont aussi dus à des valeurs plus élevées en Fe/Mn dans la feuille et dans le sol (Bongale et coll., 1996 ; Iizuka, 1985). D'ailleurs, dans cette étude, des valeurs en Fe/Mn de 5,5 et 9,5 ont été enregistrées respectivement chez les plantes normales et carencées.

EFFECT OF MOULTING HORMONE ON THE LARVAL GROWTH, COCOON CHARACTERS AND SILK QUALITY OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

MIAO YUNGEN

College of Animal Science, Zhejiang university, Hangzhou, 310029, China.

The effects of MH on the larval growth, cocoon yield, cocoon characters and reeling parameters of two bivoltine hybrid races were studied during spring and summer rearing seasons. The perusal of the data of the spring crop revealed that with a MH application at the beginning of the fifth instar, the shell weight and shell ratio % were marginally increased and with a MH application at maturation stage, the majority of the economic characters were reduced marginally with a uniform maturity compared to the control.

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., moulting hormone, cocoon character, silk quality.

INTRODUCTION

Insect hormone active substances have been studied mostly for application as a pesticide in the last twenty years. Among them ecdysone and juvenile hormone are the principle hormones regulating moulting, metamorphosis, diapause and reproduction in insects. This synthesised JH active substances had been applied in the silkworm, *Bombyx mori* to increase the silk production (Akai & Kobayashi, 1977; Otaki *et al.*, 1971). On the other hand, ecdysone active substances such as inokosterone were extracted from some plants and attempts were made to use it for growth control as an accelerator of larval maturation (Ito *et al.*, 1968).

In silkworm rearing, when confronted with a low temperature, silkworms will not uniformly mature, they could spend 2-3 days from earlier maturing to the end of maturing, and result in much difficulty for mounting management, cocoon harvest and cocoon marketing. Meanwhile it often influences the quality of cocoon filament. If the MH is administered when the silkworms start to be mature, the maturing will be uniform. It is more useful for improving the efficiency of mounting, saving mulberry leaf, improving the uniformity of pupation and being beneficial to improving the cocoon quality.

During silkworm rearing, there is often the situation of lacking mulberry leaves during the middle or the latter stage of the fifth instar since sometimes the rearing amount was not well planned or the weather is unfavourable for mulberry growth or a severe silkworm disease occurs. In that situation MH is administered to promote silkworm maturity and reduce losses due to mulberry leaf shortage or due to disease.

In recent years in China, the above technique has been used commercially with great success. Therefore, an attempt has been made in this study to see the effects of MH on larval growth, cocoon yield, cocoon characters, mounting efficiency and silk quality during spring and summer rearing seasons. The dose, mode of application and results obtained are presented and discussed.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals:

The bivoltine hybrid Qin Song × Hao Yue form the material for the study during spring crop and Xin Hang × Bai Yun form the material for the study during summer. The Hu Sang 197 variety of mulberry leaves harvested from the irrigated mulberry garden form the source of food for the silkworms in both the seasons.

During the course of the experiment in both the seasons, silkworms were mass reared by following standard rearing practices up to the fourth instar. After the fourth moult, the larvae were separated into three groups. Each group consisted of three replications, each of 100 larvae for each treatment.

Application of Moulting Hormone:

One voil (1 ml) of moulting hormone (MH)-III(phytoecdysone) solution was dissolved in 2000 ml water to make 400 ppm solution. For one group of larvae 400 ppm MH solution was sprayed on mulberry leaves and fed to silkworms during 0-24 hrs of fifth instar, for the second group of larvae MH solution was sprayed on mulberry leaves and fed to silkworm when few larvae ripen. The third group was kept as control without MH treatment. After treatment, a standard rearing method was practised till spinning.

Investigations:

In all the groups for every four hours, the number of ripened worms were counted till all worms matured. The matured larvae were mounted on plastic collapsible mountages. The cocoons were harvested on sixth day after mounting and were tested to find out the number of dead and live pupae by gently shaking the cocoons. The percentage of dead pupae was calculated based on the cocoons harvested. Larval duration, larval weight, cocoon weight, shell weight, shell ratio percentage were recorded sex wise. Defective cocoons were removed from each replication and the cocoons of uniform shape, size and hardness were selected randomly and processed for single cocoon reeling for reeling parameters such as filament length, non breakable filament length, denier, reelability and size deviation. The mean value of the parameters was calculated and presented in the tables.

RESULTS

Larval duration:

Both in the spring season or summer season, when silkworms were treated with MH at the beginning of the fifth instar, fifth instar larval duration was increased marginally (spring: 170hrs; summer: 160 hrs), a marginal reduction of the fifth instar was noticed when MH treated at spinning stage (spring: 164 hrs; summer: 152 hrs), when compared to control. The similar trend was recorded in the total larval duration (Tables I and II).

Mounting efficiency:

During the spring season, MH was applied when a few worms start spinning, 32% of the worms mature after four hours of MH application and 68% of worms mature after eight hours of application, whereas in the batch where MH was applied at the beginning of the fifth instar and in the control batch, maturation period prolongs up to 12 hrs from the beginning of maturation (Table I).

In the summer crop, a similar trend was observed. In the MH treated batch at the beginning of the maturation, within 8 hrs after application all worms mature, whereas in the batch MH treated at the beginning of the fifth instar and in the control batch, maturation continues up to 12 hrs from the beginning of the maturation (Table II).

Table I. Effects of MH on the larval growth, cocoon yield and cocoon characters (Race: Qin Song × Hao Yue).

Tableau I. Effets de l'hormone de mue sur la croissance larvaire, le rendement en cocons et les caractères du cocon (Race : Qin Song × Hao Yue).

Parameters	Time of MH application		
	5th instar (0-24h)	When few worms matures	Control
Paramètres	Moment de l'application d'HM		
	5ème âge (0-24 h)	Quand peu de vers mûrs	Témoin
5th instar larval duration (h) <i>Durée du 5ème âge (h)</i>	170	164	168
Total larval duration (h) <i>Durée larvaire totale (h)</i>	560	554	558
Mounting efficiency (%) / Efficacité de montée (%)			
After 4h of application of MH <i>Après 4h d'application d'HM</i>	26.00	32.00	24.00
After 8h of application of MH <i>Après 8h d'application d'HM</i>	63.00	68.00	67.00
After 12h of application of MH <i>Après 12h d'application d'HM</i>	11.00		9.0
10 fully grown larvae weight (g) <i>Poids de 10 larves complètement développées</i>	48.03	47.00	48.30
% of dead pupae / % de chrysalides mortes	1.33	2.00	2.00
Single cocoon weight (g) / Poids d'un cocon (g)			
Female / <i>Femelle</i>	2.34	2.15	2.34
Male / <i>Mâle</i>	2.00	0.68	2.00
Single cocoon shell weight (g) / Poids d'une coque (g)			
Female / <i>Femelle</i>	0.540	0.457	0.532
Male / <i>Mâle</i>	0.532	0.410	0.529
Cocoon shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)			
Female / <i>Femelle</i>	23.07	21.26	22.73
Male / <i>Mâle</i>	26.60	24.41	26.35
Average single cocoon weight (g) <i>Poids moyen d'un cocon (g)</i>	2.17	1.92	2.17
Average single shell weight (g) <i>Poids moyen de la coque (g)</i>	0.536	0.434	0.530
Average shell ratio (%) <i>Richesse soyeuse moyenne (%)</i>	24.70	22.60	24.42

Table II. Effects of MH on the larval growth, cocoon yield and cocoon characters (Race: Xin Hang × Bai yun)

Tableau II. Effets de l'hormone de mue sur la croissance larvaire, le rendement en cocons et les caractères des cocons (Race : Xin Hang × Bai yun).

Parameters	Time of MH application		
	5th instar (0-24h)	When few worms mature	Control
<i>Paramètres</i>	<i>Moment de l'application d'HM</i>		
	<i>5ème âge (0-24 h)</i>	<i>Quand peu de vers mûrs</i>	<i>Témoin</i>
5th instar larval duration (h) <i>Durée larvaire du 5ème âge (h)</i>	160	152	153
Total larval duration (h) / <i>Durée larvaire totale (h)</i>	494	490	492
Mounting efficiency (%) / <i>Efficacité de montée (%)</i>			
No. of worms mature after 4h of application of MH <i>Nbre de vers matures après 4h d'application d'HM</i>	4.00	20.00	4.00
After 8h of application of MH <i>Après 8h d'application de HM</i>	16.00	80.00	16.00
After 12h of application of MH <i>Après 12h d'application d'HM</i>	80.00	-	80.00
10 fully grown larvae weight (g) <i>Poids de 10 larves complètement développées</i>	45.20	44.60	44.52
% of dead pupae <i>% de chrysalides mortes</i>	1.00	2.00	3.00
Single cocoon weight (g) / <i>Poids d'un cocon (g)</i>			
Female / <i>Femelle</i>	1.91	2.04	1.98
Male / <i>Mâle</i>	1.40	1.52	1.51
Single cocoon shell weight (g) / <i>Poids d'une coque (g)</i>			
Female / <i>Femelle</i>	0.406	0.408	0.403
Male / <i>Mâle</i>	0.360	0.370	0.363
Shell ratio (%) / <i>Richesse soyeuse (%)</i>			
Female / <i>Femelle</i>	21.25	20.00	20.35
Male / <i>Mâle</i>	25.71	24.34	24.04
Average single cocoon weight (g) <i>Poids moyen d'un cocon (g)</i>	1.66	1.78	1.75
Average cocoon shell weight (g) <i>Poids moyen de la coque (g)</i>	0.383	0.389	0.383
Average shell ratio (%) / <i>Richesse soyeuse moyenne</i>	23.07	21.85	21.88

Larval weight:

Larval weight was marginally increased in the MH-treated batch at the beginning of the fifth instar (48.08 g) and in the batch MH treated at the beginning of the maturation, the larval weight was marginally decreased (47.20 g), when compared to the control (48.30g) during the spring crop (Table I).

In the summer crop, the highest larval weight (45.20g) was recorded in the batch MH treated in the beginning of the fifth instar, whereas in the control batch it was lowest (44.52g) (Table II).

% of dead pupae:

Minimum % of dead pupae (1.33%) was recorded in MH treated batch at the beginning of the fifth instar, whereas in the batch treated with MH at the maturation stage and in the control batch, it was 2.00% during the spring season (Table I).

But in the summer crop, the highest % of dead pupae (3.00%) was recorded in the control batch and the lowest (1.00%) was recorded in the MH treated at the initial stage of the fifth instar (Table II).

Single cocoon weight:

In the spring crop, the single cocoon weight value of male and female and the average of male and female was on par with each other in MH treated batch in the initial stage of fifth instar and in the control batch. A marginal reduction was noticed in the MH treated batch at maturation stage when compared to control (Table I).

Contrary to above, a marginal improvement was noticed in the MH treated batch at the maturation stage, whereas in the batch MH treated at the beginning of the fifth instar, cocoon weight was marginally reduced when compared to the control in summer crop (Table II).

Single cocoon shell weight:

During the spring season, the single cocoon shell weight was marginally improved in the female, male larvae when MH treated at the beginning of the fifth instar, but it was reduced in the batch treated with MH at the maturation stage, when compared to the control (Table I).

On the other hand, during the summer season, the single shell weight of larvae increased marginally in the batch treated with MH at the maturation stage, whereas in the batch treated with MH at the initial stage of the fifth instar, it was marginally reduced, when compared to the control (Table II).

Cocoon shell ratio %:

The shell ratio was increased marginally when larvae were treated with MH at the beginning of the fifth instar and the shell ratio % was decreased marginally when larvae were fed with mulberry leaves sprayed with MH solution at the maturation stage, when compared to control during spring and summer seasons (Table II).

Filament length:

In the spring crop, when larvae were treated with MH at the beginning of the fifth instar, a marginal improvement was recorded in the filament length, whereas in the batch treated with MH at maturation stage, the filament length was reduced when compared to the control (Table III). Contrary to the above, the filament length was increased marginally in the batch treated with MH at the spinning stage, was reduced marginally in the batch treated with MH at the initial stage of the fifth instar when compared to control during summer season (Table IV).

Table III. Effects of MH (MH-IH) on silk quality (Race: Qin Song × Hao Yue).

Tableau III. Effets de l'hormone de mue (MH-IH) sur la qualité de la soie (Race: Qin Song × Hao Yue).

Parameters	Time of MH application		
	V instar (90-24 hr)	When few worms mature	Control
<i>Paramètres</i>	<i>Moment d'application de l'HM</i>		
	<i>Vème âge (90-24 hr)</i>	<i>Quand quelques vers mûrs</i>	<i>Témoin</i>
Filament length (m) / <i>Longueur du filament (m)</i>	1159	1061	1154
Non breakable filament length (m) / <i>Longueur du filament sans rupture (m)</i>	836	817	828
Filament thickness / <i>Titre du filament (d)</i>	3.0	2.88	2.88
Reelability / <i>Dévidabilité</i>	74.63	70.59	72.37
Size deviation / <i>Déviation du titre</i>	0.11	0.12	0.09

Non breakable filament length (NBFL):

The highest NBFL (836m) was recorded in the batch treated with MH at the beginning of the fifth instar and the lowest (817m) was recorded in the batch treated with MH at the maturation stage during the spring season (Table III).

On the other hand, no improvement was observed in NBFL in the experimental batch when compared to the control during the summer season (table IV).

Filament thickness:

In the spring crop, for the MH treated in the beginning of the fifth instar, the filament thickness was increased (3.0d) and no improvement was recorded in the batch treated with MH at maturation stage (2.88d) when compared to the control (2.88d) (Table III).

During the summer season, when larvae fed with mulberry leaves sprayed with MH at the beginning of the fifth instar the filament thickness was increased (2.7 d) whereas in the larvae treated with MH at maturation stage, the filament thickness was reduced marginally (2.53 d) when compared to the control (2.73 d) (Table IV).

Table IV. Effect of MH (MH) on silk quality (Race: Xin hang × Bai Yun).

Tableau IV. Effets de l'hormone de mue (MH) sur la qualité de la soie (Race : Xin Hang × Bai Yun).

Parameter	Time of application		
	V instar (0-24 hrs)	When few worms mature	Control
Paramètres	Moment de l'application		
	Vème âge (0-24 hrs)	Quand peu de vers mûrs	Témoin
Filament length (m) / Longueur du filament (m)	858	926	870
Non breakable filament length (m) / Longueur du filament sans rupture (m)	672	618	721
Filament thickness (d) / Titre du filament (d)	2.76	2.53	2.73
Reelability (%) / Dévidabilité (%)	70.14	68.53	68.47
Size deviation / Déviation du titre	0.21	0.36	0.18

Reelability:

Reelability % was increased marginally (74.63%) when larvae were reared with MH at the beginning of the fifth instar, whereas in the batch treated with MH at the maturation stage, the reelability was reduced (70.59%), when compared to control during spring crop (Table III).

A similar trend was observed in the summer crop also.

Filament size deviation:

In the spring crop, when larvae fed with mulberry leaves sprayed with MH solution at the initial stage of the fifth instar and at the maturation stage, a larger size deviation was observed and it was 0.11 and 0.12 when compared to the control (0.09) (Table III).

In the summer crop, a similar trend was observed and a maximum value was recorded in the batches treated with MH at the maturation stage (0.36) and least was recorded in the control batch (0.18) (table IV).

DISCUSSION

According to the classical theory, the silkworms prothoracic glands synthesise and secrete the moulting hormone but at present, it was confirmed that ecdysteroids are also synthesized in the ovary of silkworm (Ohnishi, 1986). Meanwhile, a rather high ecdysteroid activity was found in the eggs and pupa of silkworm, *Bombyx mori*. Ecdysteroid changes during larval development have been described in *Bombyx mori* (Calvez *et al.*, 1981). The best results for silk production have been obtained by spraying JHA on the bodies of silkworms directly and then phytoecdysteroids on mulberry leaves to feed the later stage of the fifth instar larvae (Chou and Lu, 1980). The main functions of MH application in sericulture are:

- (1) Promote the uniform silkworm maturity
- (2) Shorten the duration of the fifth instar in special situations
- (3) Prevent or reduce the occurrence of non cocooning silkworms

The present investigation was undertaken to study the effects of MH on silkworm growth, cocoon yield and cocoon characters of two bivoltine races i.e., Qin Song $\times$ Hao Yue and Xin Hang $\times$ Bai Yun. A critical analysis of the mean data presented in Tables I-IV revealed a marginal improvement in the shell weight and shell ratio and reelability in the batches fed with mulberry leaves treated with MH during 0-24 hrs of the fifth instar. On the other hand, a marginal decrease in cocoon weight, shell weight, filament length was recorded in the batches treated with MH at maturation stage. Further by feeding silkworms with mulberry leaves treated with MH at maturation stage enhanced early and uniform maturity in silkworms compared to the control, in both the seasons.

The improvement in the characters such as uniform maturity in the batches treated with MH at maturation stage is in conformity with the observations of Hiro Takizawa and Mitsumara Sudo, 1992. Similarly the improvement in some of the commercial characters in the batches treated with MH at the beginning of fifth instar is in agreement with the findings of Dai Yujin *et al.* (1986), Osamu Ninagi and Makoto Maruyama (1996). It is opined that administration of MH can enhance apparently the activity of the fibroin synthesis in the posterior portion of the silk gland and the protein synthesis in the fat body. This is parallel with the findings of Dai Yujin *et al.*, 1986, who have reported the direct evidence for elucidating that the MH can regulate the protein synthesis of silkworm, *Bombyx mori* L.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank Prof. Lu Xuefang and Prof. Xu Junliang, the university of Zhejiang for their kind supervision. The author also thanks Dr Sateesh Kumar, Central Sericultural Research and Training Institute, India for his critical reading and improvement of the manuscript.

REFERENCES

- AKAI H. & KOBAYASHI M., 1971, Introduction of prolonged larval instar by the juvenile hormone in *Bombyx mori* L. Appl. Entomol. Zool., 6:138-139.
- CALVEZ B. 1981, Progress of developmental programme during the last larval instar of *Bombyx mori*: relationships with food intake, ecdysteroids and juvenile hormone. J. Insect Physiology 27:233-239.
- CHOU W. S. & LU H.S. 1980, Growth regulation and silk production in *Bombyx mori* L. From phytoegenous ecdysteroids. In: progress in ecdysone research (Hoffmann, J.A. ed.), Elsevier, Amsterdam, pp 281-297.
- DAI YUJIN, YAO XIANG & JIN XINHYU. 1986. Effect of ecdysone on the protein synthesis activity in some organs of the silkworm *Bombyx mori*. Sci Seric. 12(4): 223-225.
- HIROMI TAKIZAWA & MITSUMARA SUDO, 1992. Effect of administration of 20-OH-ecdysone to fifth instar parent silkworms reared on artificial diet on cocooning and egg production. J. Seric. Sci. Jpn., 61(4):341-346.

- ITO T. *et al.*, 1968 Acceleration of maturation of larvae of the silkworm by feeding of insect-moulting hormone from plants. Tech. Bull. Seric. Exp. Stn., 92:21-40.
- OHNISHI E., 1986 Ovarian ecdysteroids of *Bombyx mori*: retrospect and prospect. Zool Sci., 3: 401-407.
- OSAMU NINAGI & MAKOTO MARUYAMA, 1996. Utilisation of 20-hydrosecdysone extracted from a plant in sericulture. JARQ 30:123-128.
- OTAKI T., TAKEUCHI S. & MORI K., 1971, Juvenile hormone and synthetic analogues: Effects on larval moulting of silkworm *Bombyx mori*. Jpn. J. Med. Sci. biol., 24: 251-255.

EFFET DE L'HORMONE DE MUE SUR LA CROISSANCE LARVAIRE, LES CARACTERES DU COCON ET LA QUALITE DE LA SOIE DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

MIAO YUNGEN

College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, Chine.

Les effets de l'hormone de mue (HM) sur la croissance larvaire, le rendement en cocons, les caractères du cocon et les paramètres de dévidage de deux races bivoltines hybrides ont été étudiés pendant les saisons d'élevage du printemps et de l'été. L'étude des données sur la récolte de printemps révèle qu'avec une application d'HM au début du cinquième âge, le poids de la coque et la richesse soyeuse augmentent de manière marginale et qu'avec une application de HM au stade de maturité, la majorité des caractères économiques baissent de manière marginale et l'on obtient une maturité uniforme comparée au témoin.

INTRODUCTION

Les hormones d'insectes ont été étudiées depuis les vingt dernières années principalement pour être utilisées comme pesticide. Parmi elles, l'ecdysone et l'hormone juvénile sont les hormones principales régulant la mue, la métamorphose, la diapause et la reproduction chez les insectes. Des substances actives de JH synthétisées ont été appliquées chez le ver à soie, *Bombyx mori* pour augmenter la production de soie (Akai & Kobayashi, 1977 ; Otaki et coll., 1971). D'autre part, des substances actives d'ecdysone telles que l'inokosterone ont été extraites de certaines plantes et des essais ont été entrepris pour l'utiliser comme accélérateur de la maturation larvaire dans le cadre du contrôle de la croissance (Ito et coll., 1968).

Dans l'élevage du ver à soie, les larves ne deviennent pas matures uniformément quand la température est basse, 2 à 3 jours peuvent séparer le début de la maturation de la fin et cela entraîne de nombreuses difficultés concernant la gestion de l'encabanage et la récolte et la vente des cocons. De plus, cela a souvent des effets sur la qualité du filament du cocon. Si l'HM est administrée quand les vers à soie commencent à être matures, la maturation sera uniforme. Elle est utile pour améliorer l'efficacité de la montée, pour économiser des feuilles de mûrier, pour améliorer l'uniformité de la nymphose et pour améliorer la qualité du cocon.

Dans l'élevage des vers à soie, il arrive souvent que l'on manque de feuilles de mûrier au milieu du dernier stade du cinquième âge, car souvent la quantité à élever n'a pas été bien planifiée ou bien le temps n'est pas favorable à la croissance du mûrier. Il arrive aussi que les vers soient atteints par une maladie grave. Dans cette situation, l'HM est administrée pour promouvoir la maturation du ver à soie et réduire les pertes dues au manque de feuilles de mûrier ou à la maladie.

On a récemment utilisé commercialement cette technique avec beaucoup de succès en Chine. Ainsi, nous nous sommes attachés dans cette étude à observer les effets de l'HM sur la croissance larvaire, le rendement en cocons, les caractères du cocon, l'efficacité de la montée et la qualité de la soie pendant les élevages du printemps et de l'été. La dose, le mode d'application et les résultats obtenus sont présentés et discutés.

MATERIELS ET METHODES

Animaux d'expérimentation :

L'hybride bivoltin Qin Song × Hao Yue constitue le matériel d'étude pendant le printemps et Xin Hang × Bai Yun constitue le matériel d'étude l'été. La variété de mûrier Hu Sang 197 dont les feuilles sont récoltées dans une mûraie irriguée constitue la source de nourriture des vers à soie pendant les deux saisons.

Au cours de l'expérience pendant les deux saisons, les vers à soie ont été élevés en masse jusqu'au quatrième âge en suivant les pratiques d'élevage standard. Après la quatrième mue, les larves ont été séparées en trois groupes. Chaque groupe comprenait trois répétitions de 100 larves pour chaque traitement.

Application de l'Hormone de Mue :

Un flacon (1 ml) de solution d'hormone de mue (HM)-III(phytoecdysone) est dissous dans 2000 ml d'eau pour obtenir une solution à 400 ppm. Chez un groupe de larves, des feuilles de mûrier vaporisées avec 400 ppm de solution sont données en nourriture aux vers pendant les vingt quatre premières heures du cinquième âge, tandis que chez le deuxième groupe de larves, des feuilles de mûrier vaporisées de solution d'HM sont données en nourriture aux vers quand quelques larves commencent leur maturation. Le troisième groupe est maintenu comme témoin, sans traitement HM. Après le traitement, une méthode d'élevage standard a été utilisée jusqu'au filage.

Observations :

Le nombre de vers matures est compté toutes les quatre heures dans tous les groupes, jusqu'à ce que tous les vers soient matures. Les larves matures sont montées sur des encabanages pliants en plastique. Les cocons sont récoltés le sixième jour après la montée et l'on vérifie le nombre de larves mortes et vivantes, en secouant doucement les cocons. Le pourcentage de nymphes mortes est calculé à partir du nombre de cocons recueillis. La durée larvaire, le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse sont enregistrés selon les sexes. Les cocons défectueux sont éliminés de chaque répétition et les cocons de forme, de taille, et de dureté uniformes sont choisis au hasard et passés au dévidage simple pour observer les paramètres de dévidage, tels que la longueur du filament, la longueur du filament sans rupture, le titre, la dévidabilité et la déviation de titre. La valeur moyenne des paramètres est calculée et présentée dans les tableaux.

RESULTATS

Durée larvaire :

Pendant les deux saisons du printemps et de l'été, la durée larvaire du cinquième âge augmente de manière marginale (printemps : 170 hrs ; été : 160 hrs), quand les vers à soie sont traités avec l'HM au début du cinquième âge, tandis que l'on observe une baisse marginale de la durée du cinquième âge quand le traitement HM a lieu au stade du filage (printemps : 164 hrs ; été : 152 hrs), par comparaison au témoin. Une tendance similaire est enregistrée pour la durée larvaire totale (Tableaux I et II).

Efficacité de la montée :

Pendant la saison du printemps, lorsque l'HM est appliquée quand certains vers commencent à filer, 32 % des vers arrivent à maturité après quatre heures d'application et 68 % des vers sont matures après huit heures d'application, tandis que chez le lot où l'HM est appliquée au début du cinquième âge et chez le lot témoin, la période de maturation se prolonge de 12 hrs (Tableau I).

Une tendance similaire est observée pour la récolte d'été. Chez le lot traité à l'HM au début de la maturation, tous les vers sont mûrs après 8 hrs d'application, tandis que chez le lot traité à l'HM

au début du cinquième âge et chez le lot témoin, la maturation continue 12 heures à partir du début de la maturation (Tableau II).

Poids larvaire :

Pendant la récolte de printemps le poids larvaire augmente de manière marginale chez le lot traité avec l'HM au début du cinquième âge (48,08 g pour 10 vers) tandis que chez le lot traité à l'HM au début de la maturation, le poids larvaire baisse de manière marginale (47,20 g) par rapport au témoin (43,30 g) (Tableau I).

Pendant la récolte d'été, le poids larvaire le plus élevé (45,20 g) est enregistré chez le lot traité avec l'HM au début du cinquième âge, tandis que le poids larvaire est le plus faible (44,52 g) chez le lot témoin (Tableau II).

Pourcentage de chrysalides mortes :

Pendant la saison de printemps le pourcentage minimum de chrysalides mortes (1,33 %) est enregistré chez le lot HM traité au début du cinquième âge, tandis que chez le lot traité avec HM au stade de maturation et chez le lot témoin il est de 2 % (Tableau II).

Dans la récolte d'été, le pourcentage le plus élevé de chrysalides mortes (3,00 %) est enregistré chez le lot témoin et le plus faible (1,00%) chez le lot traité avec l'HM au début du cinquième âge (Tableau II).

Poids du cocon :

Pendant la récolte de printemps, la valeur de poids des cocons mâle et femelle et la moyenne mâle + femelle sont similaires chez le lot traité à l'HM au début du cinquième âge et chez le lot témoin. On remarque une baisse marginale chez le lot traité avec l'HM au stade de maturation par comparaison au témoin (Tableau I).

En revanche, pendant la récolte d'été on remarque une amélioration marginale chez le lot traité à l'HM au stade de maturation, tandis que chez le lot traité à l'HM au début du cinquième âge, le poids du cocon baisse de manière marginale par comparaison au témoin (Tableau II).

Poids de la coque :

Pendant la saison de printemps, le poids de la coque s'améliore de manière marginale chez les larves femelles et mâles quand elles sont traitées à l'HM au stade de maturation, tandis qu'il baisse de manière marginale, par comparaison au témoin chez le lot traité avec l'HM au stade initial du cinquième âge (Tableau II).

Richesse soyeuse :

Pendant les saisons du printemps et de l'été, la richesse soyeuse augmente de manière marginale quand les larves sont traitées avec l'HM au début du cinquième âge et la richesse soyeuse baisse marginalement quand les larves sont nourries avec des feuilles de mûrier vaporisées avec une solution HM au stade de maturation, par comparaison au témoin (Tableau II).

Longueur du filament :

Pendant la récolte de printemps, on observe une amélioration marginale de la longueur du filament, quand les larves sont traitées avec l'HM au début du cinquième âge, tandis que chez le lot traité avec l'HM au stade de maturation, la longueur du filament baisse par rapport au témoin (Tableau III). En revanche, pendant la saison d'été la longueur du filament augmente de manière marginale chez le lot traité avec l'HM au stade du filage et baisse de manière marginale chez le lot traité avec l'HM au stade initial du cinquième âge par comparaison au témoin (Tableau IV).

Longueur du filament sans rupture (NBFL) :

Pendant la saison de printemps le NBFL le plus élevé (836 m) est enregistré chez le lot traité avec l'HM au début du cinquième âge et le plus bas (817m) est enregistré chez le lot traité avec l'HM au stade de maturation (Tableau III).

D'autre part, pendant la saison d'été on n'observe aucune amélioration du NBFL chez les lots expérimentaux par comparaison au témoin (Tableau IV).

Titre du filament :

Pendant la saison du printemps, le titre du filament augmente (3,0 d) chez le lot traité avec l'HM au début du cinquième âge, et on n'enregistre aucune amélioration chez le lot traité avec l'HM au stade de la maturation (2,88d) par comparaison au témoin (2,88d) (Tableau III).

Pendant la saison d'été, le titre du filament augmente (2,7d) quand les larves sont nourries avec des feuilles de mûrier vaporisées avec l'HM au début du cinquième âge tandis que chez les larves traitées avec l'HM au stade de maturation, le titre du filament baisse de manière marginale (2,53d) par comparaison au témoin (2,73d) (Tableau IV).

Dévidabilité :

Pendant la récolte de printemps le pourcentage de dévidabilité augmente de manière marginale (74,63 %) quand les larves sont élevées avec l'HM au début du cinquième âge, tandis que la dévidabilité baisse (70,59 %) par comparaison au témoin chez le lot traité avec l'HM au stade de maturation, (Tableau III).

Une tendance similaire est observée pendant la saison d'été.

Régularité du titre du filament :

Pendant la récolte de printemps, on observe une plus grande déviation de titre quand les larves sont nourries avec des feuilles de mûrier vaporisées avec une solution d'HM au début du cinquième âge et au stade de maturation : elle est de 0,11 et de 0,12 par comparaison au témoin (0,09) (Tableau III).

Pendant la récolte d'été, une tendance similaire est observée et une valeur maximum est enregistrée chez les lots traités avec l'HM au stade de maturation (0,36) et une valeur minimum est enregistrée chez le lot témoin (0,18) (Tableau IV).

DISCUSSION

D'après la théorie classique, les glandes prothoraciques des vers à soie synthétisent et sécrètent l'hormone de mue mais à présent, il a été confirmé que les ecdystéroïdes sont aussi synthétisés dans l'ovaire du ver à soie (Ohnishi, 1986). Entre-temps, une activité plutôt élevée de l'ecdystéroïde dans les oeufs et les chrysalides du ver à soie, *Bombyx mori* a été observée. Les variations du taux d'ecdystéroïde pendant le développement larvaire ont été décrites chez *Bombyx mori* (Calvez et coll., 1981). Les meilleurs résultats par rapport à la production de soie ont été obtenus en vaporisant de la JHA (Hormone Juvénile A) directement sur les larves ou des phytoecdystéroïdes sur les feuilles de mûrier qui sont données en nourriture au dernier stade du cinquième âge (Chu et Lu, 1980). Les fonctions principales de l'HM en sériciculture sont :

- (1) Promouvoir une maturité uniforme des vers à soie.
- (2) Raccourcir la durée du cinquième âge dans des situations spéciales.
- (3) Prévenir ou diminuer l'apparition de vers à soie sans cocons.

L'étude présente a été entreprise pour étudier les effets de l'HM sur la croissance du ver à soie, sur le rendement en cocons et sur les caractères du cocon de deux races bivoltines, Qin Song × Hao Yue et Xin Hang × Bai Yun. Une analyse critique des données moyennes présentées dans les Tableaux I-IV révèle une amélioration marginale du poids de la coque et de la richesse soyeuse et de la

dévidabilité chez les lots nourris avec des feuilles de mûrier traitées avec HM pendant les 24 premières heures du cinquième âge. D'autre part, on observe une baisse marginale du poids du cocon, du poids de la coque et de la longueur du filament chez les lots traités avec l'HM au stade de maturation. En nourrissant les vers à soie avec des feuilles de mûrier traitées avec l'HM au stade de la maturation, cela favorise une maturation précoce et uniforme chez les vers à soie pendant les deux saisons.

L'amélioration des caractères tels que l'uniformité de la maturité chez les lots traités avec l'HM au stade de maturation est en accord avec les observations de Hiro Takizawa et Mitsumar Sudo, 1992. De même, l'amélioration de certains des caractères commerciaux chez les lots traités avec l'HM au début du cinquième âge, confirme les observations de Dai Yujin et coll. (1986), Osamu Ninagi et Makoto Maruyama (1996). On pense que l'administration d'HM peut améliorer l'activité de synthèse de la fibroïne dans la partie postérieure de la glande séricigène et la synthèse des protéines dans le corps gras. Ceci est en accord avec les observations de Dai Yujin et coll., 1986, qui ont apporté la preuve directe que l'HM peut réguler la synthèse des protéines chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.

EVOLUTION OF NEW PRODUCTIVE BIVOLTINE HYBRIDS CSR₂ X CSR₄ AND CSR₂ X CSR₅

R. K. DATTA, H. K. BASAVARAJA, N. MAL REDDY, S. NIRMAL KUMAR,
M. M. AHSAN, N. SURESH KUMAR & M. RAMESH BABU

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

With an objective of evolving robust bivoltine breeds/hybrids of silkworm *Bombyx mori* L., for tropical conditions, breeding programme was undertaken by utilising two Japanese hybrids namely Shunrei x Shogetsu, BN₁₈ x BCS₂₅ and an Indian popular bivoltine breed, NB₄D₂. The breed CSR₂ spinning white oval and CSR₅ spinning white dumbbell cocoons were isolated from Japanese commercial hybrid Shunrei x Shogetsu through repeated inbreeding coupled with selection, while CSR₄ spinning white dumbbell cocoons was evolved from Japanese hybrid BN₁₈ x BCS₂₅ crossed to NB₄D₂. After fixation, these breeds along with other newly evolved breeds were subjected for hybrid study using large number of hybrid combinations in the laboratory and evaluated by Evaluation Index method. The hybrids viz., CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ were found promising. The hybrids CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ recorded survival of 96.5 and 97.1%, shell weight of 46.5 and 48.7 cg, shell ratio of 23.5 and 24.1%, raw silk percentage of 20.0 and 20.5%, filament length of 1147 and 1278 m and renditta of 5.0 and 4.9 kg, respectively, whereas the control hybrid (KA x NB₄D₂) has recorded survival of 93.8%, shell weight of 40.7 cg, shell ratio of 20.5%, raw silk percentage of 17.2%, filament length of 1035 m and renditta of 5.8. The new hybrids showed neatness of above 94.4 p as against 93.3 p in control hybrid. These hybrids were authorised for commercial exploitation during 1997 by Central Silk Board based on the results obtained from 10 test centres located at various regions.

Keywords: *Bombyx mori* L., breeding, productive hybrids.

INTRODUCTION

Synthesis of new gene combinations by conventional breeding technique is one of the important tools for exploiting the phenomena of hybrid vigour in the silkworm *Bombyx mori* L. (Harada, 1961). Systematic hybridisation coupled with appropriate selection procedures have contributed to amalgamate the major economic traits of choice from selected breeds and to synthesise genotypes of desirable constitution and expression (Hirobe, 1968; Mano *et al.*, 1982; Sreerama Reddy *et al.*, 1992; Tanaka and Ohi, 1994). Keeping this in view, hybridisation of silkworm breeds with different genetic constitution can be made either by crossing two or four parental breeds depending on the traits the breeder desires to introduce for improvement of productivity (Mano *et al.*, 1988).

The concept of breeding of bivoltine breeds in India has been initiated by Harada (Anonymous, 1955) at Kalimpong and isolated chinese type strain (Plain larva and oval cocoon) Kalimpong A. (KA) and is used as one of the components for commercial hybrid production. Similarly, extraction of breeds was initiated during 1970's from commercial hybrids obtained from Japan. This has resulted in isolation of three bivoltine strains namely, NB₄D₂, NB₇ and NB₁₈ (Narasimhanna *et al.*, 1976; Krishnaswami, 1983). Similarly, CC1 and CA2 were also bred at CSRTI, Mysore (Datta, 1984). Later on, many bivoltine breeds were evolved by various breeders in India (Trag *et al.*, 1992; Raju and Krishnamurthy, 1993). However, for the last 15 years the cocoon shell ratio in bivoltine hybrids

remained constant at 20% and the realisation of cocoon shell ratio in commercial cocoon market is around 18%. This has made bivoltine crops unattractive to the farmers and reelers especially when they get similar silk content for multivoltine x bivoltine hybrids. Even though there is a quantum jump in mulberry silk production since last three decades in India, the quality of silk is poor as compared to international standards owing to the bulk of silk production comes from multivoltine x bivoltine hybrids. Therefore, it is essential that breeding strategies have to be directed towards the evolution of bivoltine strains/hybrids with high survival, shell ratio and raw silk recovery with good quality silk for commercial exploitation.

Keeping this in view, attempts have been made to evolve productive bivoltine breeds/hybrids with high silk recovery and quality.

MATERIALS AND METHODS

In the present study, two Japanese bivoltine hybrids viz., Shunrei x Shogetsu and BN₁₈ x BCS₂₅ and Indian popular breed NB₄D₂ were utilised as breeding resource materials. The former hybrid was utilised for line separation breeding and the latter one as male parent with NB₄D₂ for back cross breeding. The rearing was conducted 'enmasse'. The larvae were reared as per standard techniques recommended by Krishnaswami (1978).

Selection and breeding methods

CSR₂ (Oval line): The line CSR₂ was evolved from Japanese commercial hybrid Shunrei x Shogetsu. The F₁ was reared in mass during November-December 1992. The larvae of this hybrid were marked and spun white and intermediate shape cocoons. On the basis of size and compactness, selection of cocoons was done for continuation of further generation. At F₂ (transgressive segregants) the segregants of marked larvae and dumbbell cocoons were separated from the breeding lines of plain larvae and oval cocoons. The selected cocoons on their individual merit were pooled and mated 'enmasse'. From F₃ onwards, cellular rearing was resorted to. The batch showing best performance for viability, cocoon shape, yield, cocoon traits and reeling characters were selected. The individuals which were above the batch mean were selected for continuation of further generation. During the course of breeding, emphasis was laid on high viability, high cocoon shell ratio, high raw silk percentage with high quality silk (neatness). The breeding process of CSR₂ is given in Fig. 1. The reeling characters related to breeding such as filament length, denier, raw silk percentage, neatness, boil-off ratio were considered in each generation for further continuation.

Characteristics of CSR₂:

The larvae are plain and bluish white in colour. Cocoons are white and oval with fine grains. Larval duration is around 24 days. The cocoon shell ratio, raw silk %, filament length and neatness are good.

CSR₄ (Dumbbell line):

The line CSR₄ was evolved from the Indian popular breed NB₄D₂ by crossing with Japanese bivoltine hybrid BN₁₈ x BCS₂₅. Mass rearing was conducted at F₁. From F₂ onwards cellular rearing was resorted to. Two successive back crossing with NB₄D₂ was done at F₂ and F₃ to fix the cocoon shape. During the course of breeding, viability, cocoon yield and high cocoon shell ratio with high quality silk were mainly considered and mating was performed between the females and males from the cocoons of above average of cocoon weight, cocoon shell weight and cocoon shell ratio. The breeding process of CSR₄ is given in Fig. 2.

Characteristics of CSR₄:

The larvae are plain and bluish white in colour. Cocoons are white and dumbbell with medium grains. Larval duration is around 24 days. The cocoon shell ratio %, filament length and neatness are good.

CSR₅ (Dumbbell line):

The line CSR₅ was also evolved like CSR₂ from Japanese commercial hybrid Shunrei x Shogetsu. At F₂ (transgressive segregants) the segregants of marked larvae dumbbell cocoons were separated from the breeding line of plain larvae and dumbbell cocoon. The selected cocoons on their individual merit were pooled and mated 'enmasse'. From F₃ onwards cellular rearing was resorted to. The batch showing best performance for cocoon shape, viability, cocoon yield, cocoon characters and reeling characters were selected. The individuals which were above the batch mean were selected for continuation of further generation. During the course of breeding, robustness (viability), cocoon yield and high cocoon shell ratio with high quality silk were mainly considered. The breeding process of CSR₅ is given in Fig. 3.

Characteristics of CSR₅:

The larvae are plain and bluish white in colour. Cocoons are white with cream colour and dumbbell with medium grains. Larval duration is around 24 days. The shell weight, shell ratio, raw silk %, filament length and neatness are good.

After fixation, these breeds along with other newly evolved breeds were subjected for hybrid study under optimum environmental conditions in the laboratory for expression of full potential of the genotypes. One hundred eighty six hybrids were evaluated by Evaluation Index method (Mano *et al.*, 1993 and Mano, 1994). The hybrids viz., CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ were found promising.

Characteristics of new hybrids CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅:

The larvae are bluish white and plain. Cocoons are white and intermediate shape between oval and dumbbell (Figs. 4 and 5). Larval period is around 23-24 days. The most prominent characters of these hybrids are high survival, high cocoon shell ratio, longer filament length and high quality raw silk. The hybrids are robust. This makes easy rearing at farmers level if hygienic conditions are good. These hybrids are recommended for rearing during favourable seasons i.e., August - February with selected farmers having irrigated mulberry.

Observations were made on various silk contributing parameters like survival, cocoon yield/10,000 larvae, cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell ratio, raw silk percentage, filament length, filament size, neatness, reelability and renditta. In addition, boil-off ratio and filament size deviation of these hybrids were also estimated. The percent improvement of evolved breed/hybrid over control breeds (KA and NB₄D₂) / hybrid (KA x NB₄D₂) for various characters was calculated as follows:

$$\frac{\text{Evolved breed/hybrid value} - \text{Control breed/hybrid value}}{\text{Control breed/hybrid value}} \times 100$$

RESULTS**Parental breeds:**

The generation-wise mean values of ten economic traits of the breeding lines CSR₂, CSR₄ and CSR₅ are presented in Tables I, II and III respectively. The mean values and the percent improvement over control breeds KA and NB₄D₂ are presented in Tables IV and V.

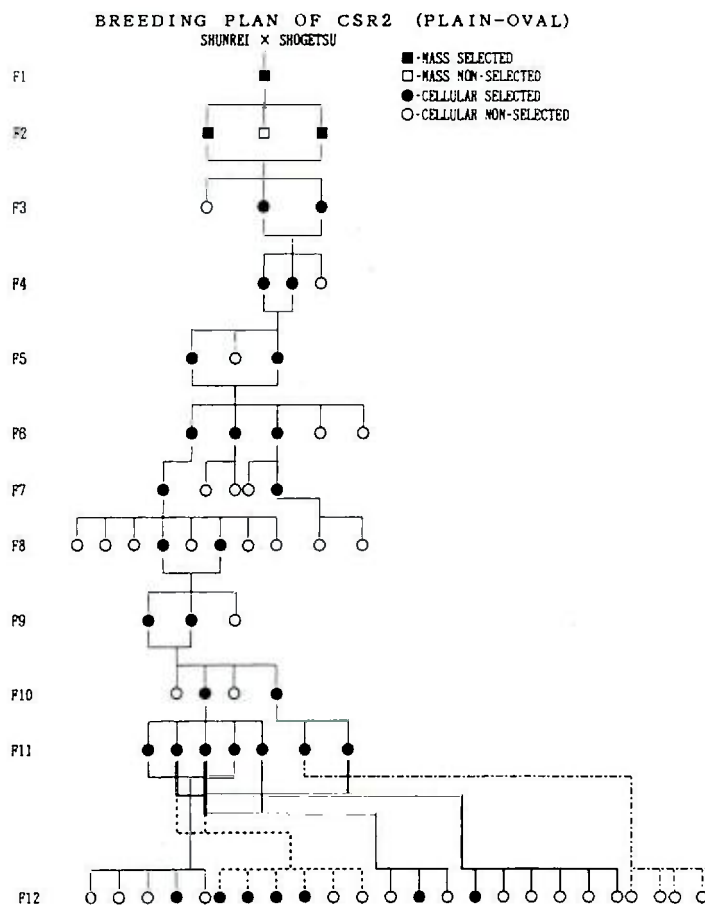


Fig. 1: Breeding process of CSR₂

Fig. 1 : Processus du breeding de CSR₂

The perusal of data for the trait survival percentage shows that there was slight decline at F₅ in CSR₂ (78.30%) and CSR₅ (71.24%) and at F₇ in CSR₄ (73.66%). The maximum survival percentage was recorded at F₁₀ in CSR₂ (94.88%), at F₄ in CSR₄ (95.91%) and at F₁₃ in CSR₅ (90.23%). The percent improvement observed over KA was 19.3 in CSR₂. Whereas the improvement noticed over NB₄D₂ in CSR₄ (0.4%) was marginal and no improvement in CSR₅. The maximum cocoon yield / 10,000 larvae was observed at F₂ in CSR₂, CSR₅ (19.8 kg) and CSR₄ (20.5 kg). However, there was a decline at F₇ in these breeds (CSR₂ - 14.8 kg, CSR₄ - 13.8 kg and CSR₅ - 12.1 kg). The percent improvement over KA was 17.1 in CSR₂, whereas no improvement was recorded in CSR₄ and CSR₅ over control breed NB₄D₂. The maximum cocoon weight was recorded at F₂ in CSR₂ and CSR₅ (2.25 g) and at F₁ in CSR₄ (2.20 g). The minimum cocoon weight was observed at F₇ in CSR₂ (1.66 g) and CSR₅ (1.65 g) and at F₆ in CSR₄ (1.63 g). The data indicates that there was no improvement in cocoon weight in these breeds over control breeds KA and NB₄D₂. The maximum cocoon shell weight was recorded at F₂ in CSR₂ and CSR₅ (56.5 cg) and at F₁ in CSR₄ (51.6 cg). Maximum percent improvement over KA was observed in CSR₂ (42.9) whereas in CSR₄ and CSR₅, the percent improvement over NB₄D₂ was 6.4 and 12.0 respectively. The cocoon shell ratio % in CSR₂ was above

24 from F₁ onwards but in the case of CSR₄ and CSR₅, it was ranging from 20.4 - 23.4% and 22.8 - 25.1% respectively. The highest cocoon shell ratio % was 25.8 at F₁₁ in CSR₂, at F₁ in CSR₄ (23.4%) and at F₂ in CSR₅ (25.1%). Maximum improvement was noticed in CSR₂ (26.4%) followed by CSR₅ (14.9%) and CSR₄ (7.0%).

The maximum raw silk % was recorded at F₆ in CSR₂ (20.1%), at F₁₀ in CSR₄ (19.7) and F₆ in CSR₅ (20.3). It was ranging from 17.5 - 20.1% in CSR₂, 16.4 - 19.7% in CSR₄ and 17.4 - 20.3% in CSR₅. The percent improvement over control breeds was 26.4 in CSR₂, 0.9 in CSR₄ and 7.9 in CSR₅. The filament length varied from 1048 - 1179 m in CSR₂, 905 - 1436 in CSR₄ and 962 - 1179 m in CSR₅. There was a declining trend in filament length from F₁ onwards in CSR₄ and F₂ onwards in CSR₅ but stabilised at F₈ in CSR₄ and F₉ in CSR₅. However, in CSR₂, this trend was not observed. All new breeds were recorded improvement in this character over control breeds. The improvement was 22.8% in CSR₂, 9.5% in CSR₄ and 13.5% in CSR₅. The maximum denier was observed at F₃ in CSR₂ (3.69 d), at F₁₀ in CSR₄ (3.32 d) and F₆ in CSR₅ (3.38 d). The reelability was ranging from 77 - 84% in CSR₂, 62 - 84% in CSR₄ and 69 - 86% in CSR₅. The maximum neatness was recorded at F₁₂ in CSR₂ (92.8 p) and CSR₄ (93.3 p) and at F₁₃ in CSR₅ (94.5).

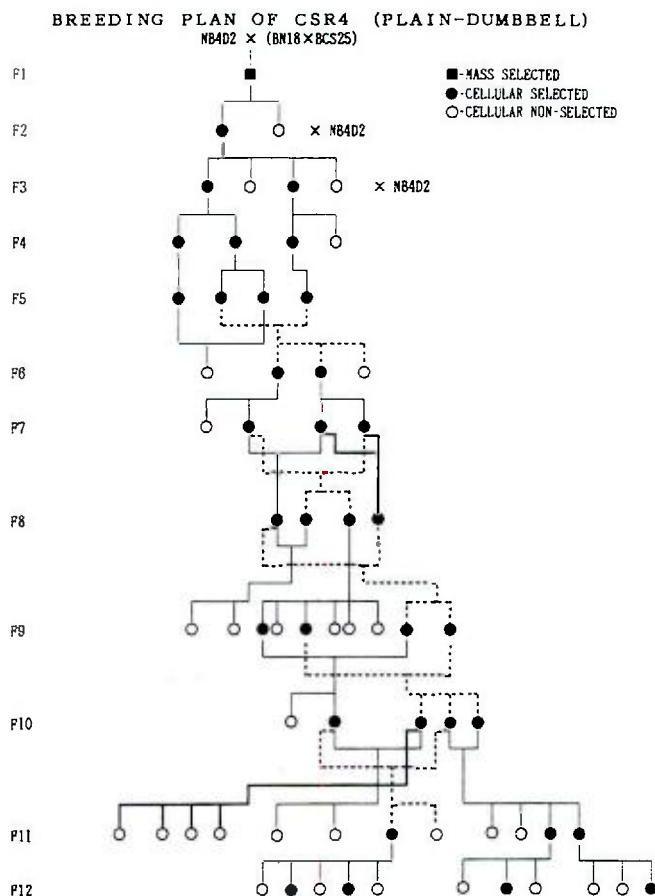


Fig. 2: Breeding process of CSR₄

Fig. 2 : Processus du breeding de CSR₄

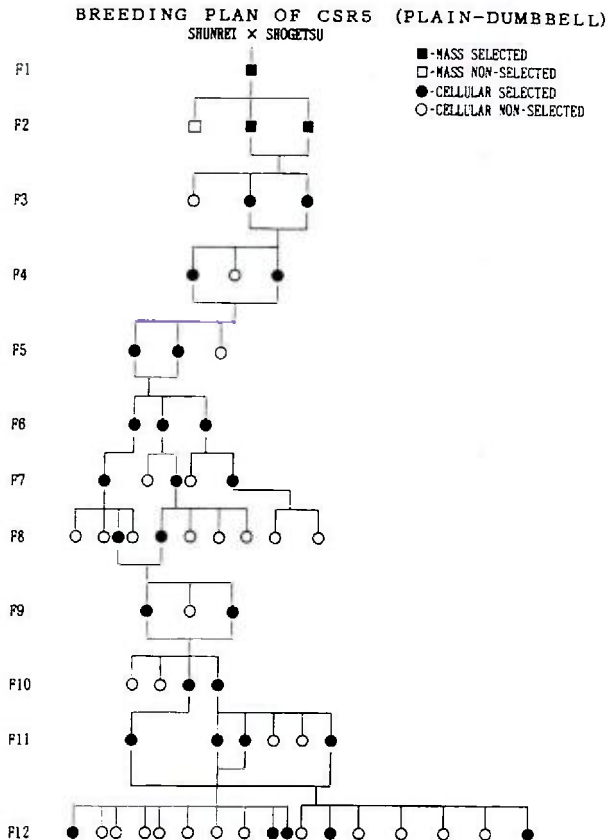


Fig. 3: Breeding process of CSR₅

Fig. 3 : Processus du breeding de CSR₅

Hybrids:

The laboratory performance of new hybrids is presented in Table VI.

The hybrids CSR₂ × CSR₄ and CSR₂ × CSR₅ recorded an average survival of 96.5 and 97.1% respectively over control hybrid KA × NB₄D₂ (93.8%). The percent improvement in CSR₂ × CSR₄ and CSR₂ × CSR₅ was 2.7 and 3.3% respectively. The cocoon yield of 19.41 and 19.74 kg/10,000 larvae was recorded in CSR₂ × CSR₄ and CSR₂ × CSR₅ respectively as against control hybrid (19.09 kg). CSR₂ × CSR₄ and CSR₂ × CSR₅ recorded the cocoon weight of 1.978, 2.025 g respectively, whereas the control hybrid recorded cocoon weight of 1.988 g. Maximum cocoon shell weight (48.7 cg) was observed in CSR₂ × CSR₅ followed by CSR₂ × CSR₄ (46.5 cg) as against control (40.7 cg). CSR₂ × CSR₄ and CSR₂ × CSR₅ recorded improvement (14.2 and 19.6%) over control. Cocoon shell ratio in CSR₂ × CSR₄ and CSR₂ × CSR₅ was 23.5 and 24.1% respectively as compared to control hybrid (20.5%). The improvement of 14.7 and 17.8% over control was noticed in CSR₂ × CSR₄ and CSR₂ × CSR₅ respectively.

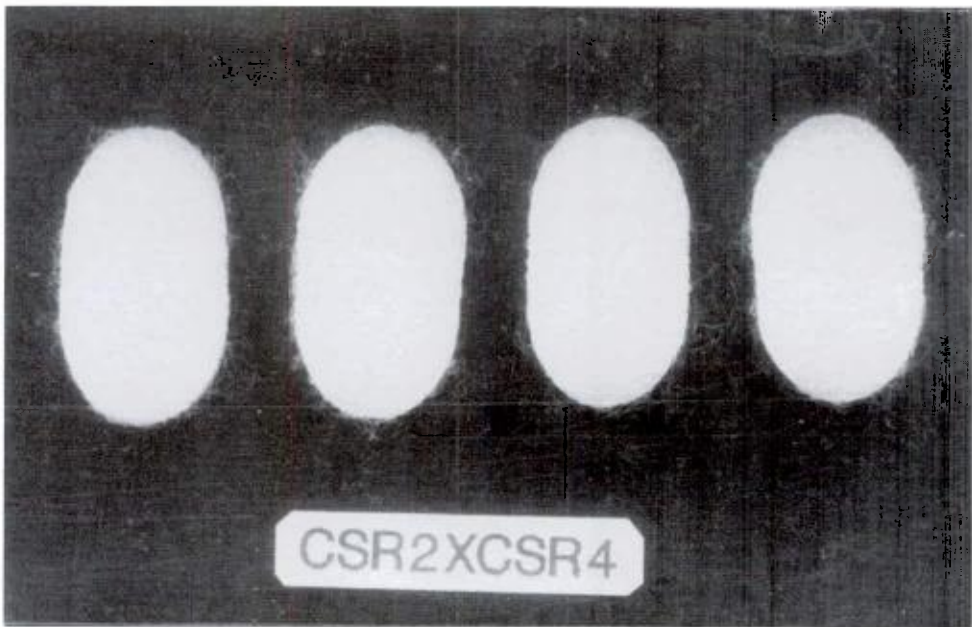


Fig. 4: Cocoons of CSR₂ x CSR₄/ Fig. 4 : Cocons de CSR₂ x CSR₄

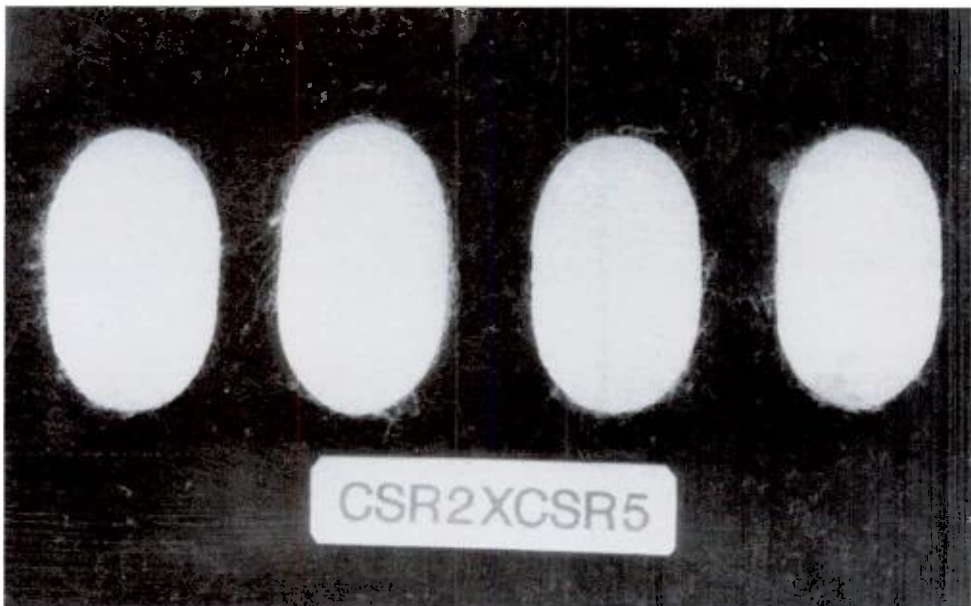


Fig. 5: Cocoon of CSR₂ x CSR₅/ Fig. 5 : Cocons de CSR₂ x CSR₅

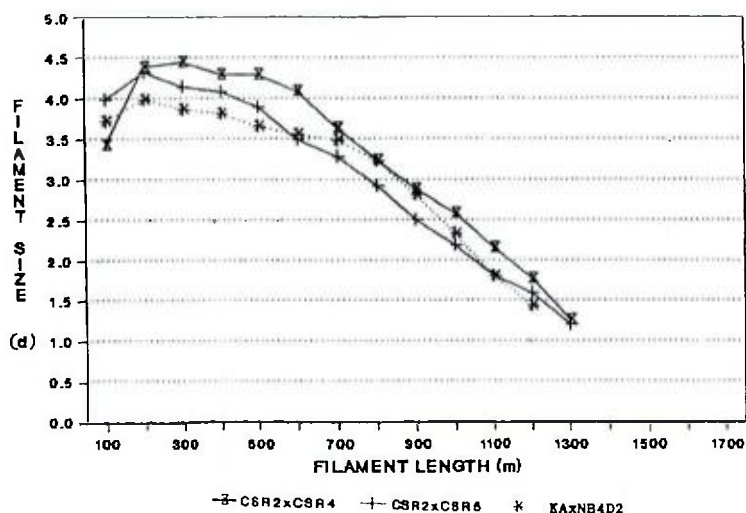


Fig. 6: Filament size deviation of CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅

Fig. 6 : Variation du titre de la bave chez CSR₂ x CSR₄ et CSR₂ x CSR₅

The raw silk recovery in CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ was 20 and 20.5% respectively as against control (17.2%). CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ recorded an improvement of (16.3 and 19.0%) respectively over control. The filament length in CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ was 1147 and 1218 m respectively as compared to control hybrid (1035 m). The improvement noticed over control was 10.7 and 17.6% in CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ respectively. Filament size recorded for CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ was 3.18 and 3.08 d respectively as against 3.0 d in control hybrid. CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ recorded reelability of 85 and 79% respectively compared to control (81%). CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ recorded neatness of 94.4 and 95.3 p respectively as against control (93.3 p). The renditta in CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ was 5.00 kg and 4.88 kg respectively as against 5.81 kg recorded for control. The hybrids CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ recorded boil-off ratio of 24.4 and 23.8% respectively as against 24.8% in control hybrid. The silk filament size deviation of these hybrids is given in Fig. 6. The hybrid CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ recorded less deviation in filament size.

Testing at Regional Sericultural Research Stations (RSRSs):

After systematic evaluation at laboratory, the hybrids CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ were tested at RSRSs (three) of Central Silk Board along with control hybrid. The performance is given in Table VII. The perusal of data indicates that CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ performed better over control hybrid in respect of cocoon shell weight, cocoon shell ratio, raw silk % and renditta. Interestingly, the renditta recorded for CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ was 5.2 and 5.0 respectively as against control (6.5). The percent improvement noticed in CSR₂ x CSR₄ for cocoon shell weight was 22.9 ; shell ratio 20.3 and raw silk % 23.2, whereas the percent improvement in CSR₂ x CSR₅ was 25.1, 22.6 and 27.1 respectively. However, the improvement was non significant for other characters like survival, cocoon yield and filament length.

Table I. Performance of CSR₂ during the process of breeding.*Tableau I. Performances de CSR₂ pendant le processus du breeding.*

Generation	Survival (%)	Cocoon / yield/ 10000 larvae (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Reelability (%)	Neatness (p)
<i>Génération</i>	<i>Survie (%)</i>	<i>Rendement de cocons / 10000 larves (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids des coques (cg)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>	<i>Titre (d)</i>	<i>Dévi -dabilité (%)</i>	<i>Netteté (p)</i>
F1	85.14	17.3	1.94	48.1	24.7	19.9	1079	3.16	78	86.5
F2	80.98	19.8	2.25	56.5	25.1	19.8	1179	3.22	79	92.0
F3	92.00	18.9	2.05	50.2	24.5	18.7	1139	3.69	82	83.0
F4	90.12	19.5	2.16	53.4	24.7	17.5	1154	3.19	84	91.3
F5	78.30	15.1	1.92	47.1	24.5	19.4	1124	3.15	78	92.0
F6	94.67	17.2	1.83	46.8	25.6	20.1	1100	3.11	84	91.0
F7	89.96	14.8	1.66	42.0	25.4	19.2	1108	3.17	78	91.0
F8	85.63	15.9	1.89	47.8	25.3	20.0	1128	3.07	78	85.4
F9	89.33	17.4	2.00	47.4	23.8	18.8	1048	3.27	77	90.5
F10	94.88	18.9	1.99	50.1	25.2	19.2	1101	3.12	78	90.2
F11	94.65	17.6	1.86	48.0	25.8	18.7	1094	3.21	79	92.1
F12	91.36	17.6	1.92	46.3	24.1	19.6	1062	3.12	82	92.8
F13	86.83	16.8	1.93	47.2	24.4	19.1	1082	3.23	84	92.4
Mean / <i>Moyenne</i>	88.76	17.4	1.95	48.53	24.85	19.2	1107	3.21	80	90.0
S. D. / <i>Ecart type</i>	5.0	1.5	0.1	3.4	0.6	0.7	35	0.1	2.6	2.9

Table II. Performance of CSR₄ during the process of breeding.Tableau II. Performances de CSR₄ pendant le processus du breeding.

Generation	Survival (%)	Cocoon yield/ 10000 larvae (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (eg)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Ree lability (%)	Neatness (p)
Génération	Survie (%)	Rendement de cocons /10000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids des coques (cg)	Richesse soyeuse (%)	Soie grège (%)	Longueur de la bave (m)	Titre (d)	Dévi -labilité (%)	Netteté (p)
F1	86.67	18.1	2.20	51.6	23.4	18.6	1436	2.63	84	89.4
F2	92.17	20.5	2.17	49.2	22.7	15.7	1029	3.08	82	89.0
F3	92.83	20.3	2.18	44.6	20.4	16.9	1109	2.98	62	85.5
F4	95.91	19.8	2.01	42.4	21.2	15.8	910	3.23	68	84.2
F5	89.59	16.5	1.81	40.5	22.3	17.1	906	3.11	75	88.0
F6	92.42	14.4	1.63	34.5	21.2	17.6	1015	2.59	68	85.8
F7	73.66	13.8	1.90	39.7	20.8	16.6	1000	2.88	76	89.2
F8	84.30	15.0	1.76	37.2	21.1	16.4	905	2.95	69	87.3
F9	85.13	15.8	1.88	42.3	22.5	16.9	962	3.17	73	92.5
F10	85.57	14.8	1.73	39.9	23.1	19.7	921	3.32	77	87.3
F11	93.25	15.6	1.81	39.2	21.6	17.1	939	3.01	79	93.1
F12	85.55	16.6	1.96	41.3	21.1	16.4	907	3.24	73	93.3
F13	93.31	17.8	1.91	42.5	22.3	16.7	962	3.14	75	92.4
Mean / Moyenne	88.49	16.8	1.92	41.9	21.8	17.0	1000	3.03	74	89.0
S. D. Ecart type	5.7	2.2	0.2	4.4	0.9	1.0	139	0.2	5.9	2.9

Table III. Performance of CSR₅ during the process of breeding.Tableau III. Performances de CSR₅ pendant le processus du breeding.

Generation	Survival (%)	Cocoon yield/10000 larvae (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Rec lability (%)	Neatness (p)
Génération	Survie (%)	Rendement de cocons /10000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids des coques (cg)	Richesse soyeuse (%)	Soie grège (%)	Longueur de la bave (m)	Titre (d)	Dévi -dabilité (%)	Netteté (p)
F1	85.14	17.3	1.94	48.1	24.7	19.9	1079	3.16	78	86.5
F2	80.98	19.8	2.25	56.5	25.1	19.8	1179	3.22	79	92.0
F3	81.67	14.4	1.76	40.1	22.8	19.8	1005	2.95	86	92.0
F4	80.91	16.1	1.99	48.2	24.2	18.9	1114	2.65	85	92.8
F5	71.24	13.1	1.91	47.7	25.0	19.2	987	3.01	82	92.4
F6	89.56	16.6	1.88	45.6	24.2	20.3	1001	3.38	82	89.5
F7	75.24	12.1	1.65	40.7	24.7	19.0	1007	2.95	84	92.0
F8	88.41	14.8	1.79	43.6	24.4	20.2	1005	3.30	81	85.5
F9	72.33	12.5	1.89	41.7	23.3	17.4	978	3.16	69	93.3
F10	86.18	16.9	1.96	47.7	24.4	18.6	965	2.98	82	91.3
F11	85.48	15.6	1.82	42.5	23.4	19.2	974	3.12	79	92.3
F12	83.42	15.2	1.79	41.3	23.1	18.9	982	3.14	81	92.5
F13	90.23	16.3	1.81	42.8	23.6	18.7	962	3.12	72	94.5
Mean / Moyenne	82.37	15.4	1.9	45.1	24.1	19.2	1018	3.09	80	91.3
S. D. Ecart type	6.0	2.0	0.1	4.4	0.7	0.8	63	0.2	4.7	2.5

Table IV. Comparison of mean values of new breeds (CSR₂, CSR₄ and CSR₅) after stabilisation (From F₉ to F₁₃).

Tableau IV. Comparaison des valeurs moyennes des nouvelles lignées (CSR₂, CSR₄ et CSR₅) après leur stabilisation (de F₉ à F₁₃).

Breed	Survival (%)	Cocoon yield/ 10000 larvae (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Ree lability (%)	Neatness (p)
<i>Lignée</i>	<i>Survie (%)</i>	<i>Rendement de cocons /10000 larves (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids des coques (cg)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>	<i>Titre (d)</i>	<i>Dévi -dabilité (%)</i>	<i>Netteté (p)</i>
CSR ₂	91.41	17.7	1.94	47.8	24.7	19.1	1077	3.19	80	91.6
CSR ₄	88.56	16.1	1.86	41.0	22.1	17.4	938	3.18	75	91.7
CSR ₅	83.53	15.3	1.84	43.2	23.8	18.6	972	3.10	77	92.8
KA*	76.61	15.1	1.96	33.4	19.4	15.1	878	2.98	78	89.6
NB4D2*	88.20	16.4	1.86	38.6	20.7	17.2	857	3.12	79	87.4
CD at 5%	8.4	—	—	2.7	0.73	1.1	93	—	—	2.8

* Control breeds / * *Lignées témoins*

Table V. Percent improvement of newly evolved breeds.

Tableau V. Amélioration en pourcentage des nouvelles lignées.

Breed	Survival (%)	Cocoon yield/ 10000 larvae (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Ree lability (%)	Neatness (p)
<i>Lignée</i>	<i>Survie (%)</i>	<i>Rendement de cocons /10000 larves (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids des coques (cg)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>	<i>Titre (d)</i>	<i>Dévi -dabilité (%)</i>	<i>Netteté (p)</i>
CSR ₂ vs KA	19.3	17.1	-0.8	42.9	26.9	26.4	22.8	7.1	2.6	2.2
CSR ₄ vs NB4D2	0.4	-1.6	-0.2	6.4	7.0	0.9	9.5	1.9	-4.6	5.0
CSR ₅ vs NB4D2	-5.3	-6.6	-1.3	12.0	14.9	7.9	13.5	-0.4	-3.0	6.2

Table VI. Mean values and percent improvement in new hybrids (mean of four seasons at laboratory).

Tableau VI. Valeurs moyennes et pourcentage d'amélioration des nouveaux hybrides (moyenne de quatre saisons en laboratoire).

Hybrid	Survival (%)	Cocoon / yield 10000 larvae (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Reelability (%)	Neatness (p)	Re-ditta	Boil-off ratio (%)
Hybride	Survie (%)	Rendement de 10000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)	Richesse soyeuse (%)	Soie grège (%)	Longueur de la bave (m)	Titre (d)	Déviabilité (%)	Netteté (p)	Rendement à la bassine	Perte au décreusage (%)
CSR2 x CSR4	96.5	19.410	1.978	46.5	23.5	20.0	1147	3.18	85	94.4	5.00	24.4
CSR2 x CSR5	97.1	19.740	2.025	48.7	24.1	20.5	1218	3.08	79	95.3	4.88	23.8
KA x NB4D2 (Control / Témoin)	93.8	19.089	1.988	40.7	20.5	17.2	1035	3.00	81	93.3	5.81	24.8
CD at 5%	1.88	—	—	4.2	1.2	1.3	—	—	—	—	—	—
Percent improvement over control hybrid / Pourcentage d'amélioration par rapport aux hybrides témoins												
CSR2 x CSR4	2.7	1.7	-0.5	14.2	14.7	16.3	10.7	5.8	4.0	1.2		
CSR2 x CSR5	3.3	3.4	1.9	19.6	17.8	19.0	17.6	3.1	-2.8	2.1		

Authorisation test at different test centres:

Based on the performance of these hybrids both at laboratory and RSRS levels they were subjected for race authorisation test conceived and implemented by the Central Silk Board (CSB), Government of India during 1996. These hybrids were tested in 10 centres located at different regions in spring and autumn. The mean test results of these hybrids at all the centres under race authorisation test was given in Table VIII. The overall performance of these hybrids indicate their superiority over check values for fourteen characters out of eighteen tested.

DISCUSSION

The bivoltine hybrids for commercial exploitation are very few and silk recovery from which is very much limited besides being ungradable. With growing emphasis to popularise bivoltine sericulture under Indian tropical/sub-tropical conditions, it is thus become imperative to develop productive and quality bivoltine hybrids for commercial use. Accordingly, for improving the characters particularly silk recovery and silk quality, breeding work was initiated to evolve productive bivoltines. With this objective, Japanese hybrids which are known for high productive and silk quality were utilised as breeding material (Mano *et al.*, 1994). Further, back crossing was made (for CSR4) at initial generations followed by inbreeding and selection in order to stabilise the cocoon shape, viability and productive characters in the progenies.

Table VII. Performance of CSR2 x CSR4 and CSR2 x CSR5 at Regional Sericultural Research Stations (Mean of 3 centres during 94-95).

Tableau VII. Performances de CSR2 x CSR4 et de CSR2 x CSR5 dans les Stations Séricicoles Agricoles Régionales (Moyennes de 3 centres de 94 à 95).

Hybrid	Survival (%)	Cocoon yield 10000 larvae (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Raw silk (%)	Filament length (m)	Denier (d)	Reela bility (%)	Neatness (p)	Renditta-
Hybride	Survie (%)	Rendement de 10000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)	Richesse soyeuse (%)	Soie grège (%)	Longueur de la bave (m)	Titre (d)	Dévi dabilité (%)	Netteté (p)	Rendement à la bassine
CSR2 x CSR4	94.6	20.21	2.101	49.4	23.5	19.4	1070	3.30	87	94.5	5.2
CSR2 x CSR5	90.3	19.19	2.097	50.3	23.9	20.0	1096	3.38	88	90.5	5.0
KA x NB4D2	89.0	19.26	2.052	40.2	19.5	15.7	1041	3.04	87	95.0	6.5
(Control / Témoin)											
CD at 5%	—	—	—	4.2	1.4	2.1	—	—	—	—	—
Percent improvement over control hybrid / Pourcentage d'amélioration par rapport aux hybrides témoins											
CSR2 x CSR4	5.6	4.9	2.4	22.9	20.3	23.2	2.8	8.7	0.1	—0.5	
CSR2 x CSR5	1.3	—0.4	2.2	25.1	22.6	27.1	5.3	11.2	1.0	—4.7	

Table VIII. Performance of CSR2 x CSR4 and CSR2 x CSR5 under race authorisation test (Mean of spring and autumn seasons of ten test centres during 1996).

Tableau VIII. Performance des hybrides CSR2 x CSR4 et de CSR2 x CSR5 en cours d'autorisation (Moyennes obtenues au printemps et à l'automne sur 10 centres de test, en 1996).

SI No	Character	CSR2 x CSR4	CSR2 x CSR5	Check value
No.	Caractéristique de série			Valeurs témoins
1	Hatching (%) / <i>Ecllosion (%)</i>	95	95	95
2	Larval period (days) / <i>Durée de la période larvaire (jours)</i>	24.36	24.43	25
3	Total missing larvae (%) / <i>Total des larves manquantes (%)</i>	8.2	8.4	9
4	Pupation rate (%) / <i>Taux de pupaison (%)</i>	92	90	90
5	Cocoon yield/25000 larvae (kg) <i>Rendement de cocons / 25000 larves (kg)</i>	4.06	3.84	3.7
6	Good cocoon (%) / <i>Cocons de bonne qualité (%)</i>	93.9	93.5	90
7	Double cocoon (%) / <i>Cocons doubles (%)</i>	2.2	2.2	9
8	Cocoon/litre (No) / <i>Nbre Cocons / litre</i>	77	76	70
9	Cocoon weight (g) / <i>Poids des cocons (g)</i>	1.79	1.77	1.75
10	Shell weight (cg) / <i>Poids des coques (cg)</i>	40.0	40.0	40
11	Shell ratio (%) / <i>Richesse soyeuse (%)</i>	22.2	22.6	21
12	Filament length (m) / <i>Longueur de la bave (m)</i>	920	941	990
13	Filament weight (cg) / <i>Poids du filament (cg)</i>	28.0	30.0	20
14	Filament size (d) / <i>Titre de la bave (d)</i>	2.75	2.83	2.5
15	Reelability (%) / <i>Dévidabilité (%)</i>	80	83	75
16	Raw silk (%) / <i>Soie grège (%)</i> (Based on wet base / <i>sur base humide</i>)	33.8	35.2	35.7
17	Boil-off loss (%) / <i>Perte au décreusage (%)</i>	21.4	22.3	27
18	Neatness (%) / <i>Netteté (%)</i>	92	89	85

Source: Central Silk Board, Bangalore.

Systematic breeding approach in designing experimental protocol coupled with selection of desirable traits in hybrids have enabled the Chinese and Japanese silkworm breeders to develop productive breeds and to achieve a remarkable progress in the improvement of several quantitative and qualitative traits of economic value (Harada, 1961; Gamo, 1976; Hirobe, 1968; Mano *et al.*, 1988 and 1991; He Yi *et al.*, 1991; Chen He rui *et al.*, 1994; Tanaka and Ohi, 1994). As a result, the characters like cocoon weight and shell weight has shown to respond to selection (Kurasawa, 1968 b and Gamo and Hirabayashi, 1983). It is known that crossing of two strains with different genetic background produces heterozygosity in all the polygenetically inherited characters and results in heterozygous population on which selection can be operated to select the desirable lines and to fix them in a suitable genotype. Therefore, utmost care was taken to raise larger population size in earlier generations (F_1 and F_2) to ensure a greater scope for expression of such desired lines and their selection over generations.

The data presented in Tables IV and V clearly indicate that the oval breed CSR₂ surpasses the control breed KA in characters like survival, cocoon yield, shell weight, shell ratio %, raw silk % and filament length. In dumbbell breeds (CSR₄ and CSR₅), the improvement noticed over existing dumbbell breed NB₄D₂ in the characters like shell weight, shell ratio, raw silk % and filament length. The involvement of these two new breeds viz., CSR₄ and CSR₅ with oval breed CSR₂ for improvement of many quantitative and qualitative characters indicated the superiority of the new breeds as evidenced by improvement of various quantitative and qualitative characters in hybrids viz., CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅. Like parental breeds, the new hybrids also surpass the control hybrid in many quantitative and qualitative characters. Though there was not much improvement in the survival and cocoon yield of the new hybrids over control hybrid (KA x NB₄D₂), improvement was noticed in shell weight, shell ratio, raw silk recovery, filament length and renditta in CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅. Further, the confirmation of the same results at RSRS for these new hybrids as at the breeder's level indicates the consistency of the hybrids.

In silkworm, the selection for one character is found to result in correlated changes in the other quantitative characters of economic importance (Kobari and Fujimoto, 1966). For example, survival and productivity traits which are of high economic value, are negatively correlated with each other. As seen in the present breeding study, keeping the cocoon weight at level as in control hybrid, the productive traits (shell weight, shell ratio, raw silk and filament length) and qualitative trait (neatness) were improved. For the first time Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore has developed these hybrids with higher silk quantity and quality by adopting the new concept of breeding strategies (Basavaraja *et al.*, 1994). Based on the test results obtained from test centres, these hybrids viz., CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅ were authorised for commercial exploitation by Central Silk Board during 1997.

Since these hybrids (CSR₂ x CSR₄ and CSR₂ x CSR₅) are characterised for their high productivity, they are recommended for rearing during favourable seasons only (September to February in South India and during spring in temperate/sub-tropical zones) with selected farmers having assured irrigated mulberry garden. Further, hybrids tolerant to high temperature have been evolved to suit the high temperature seasons/zones. Presently, they are under testing in all centres located at different regions for authorisation.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Mrs. Kshama Giridhar, Deputy Director (Stat.) for her help in data analysis.

REFERENCES

ANONYMOUS (1955) Annual Report of CSRI, Berhampore.

- BASAVARAJA H. K., SURESH KUMAR N., MAL REDDY N., DATTA R. K. (1994) New approaches to bivoltine silkworm breeding. National workshop on silkworm breeding. University of Mysore, Mysore, March 18-19th.
- CHEN HE-RUI, JIN, YUN-YU, HUANG ZI-XIU, RUAN, GUAN-HUA, YAO LU-SONG (1994) Breeding of new silkworm variety *Fanhura chunmei* for spring rearing. *Canye Kexue*, 20 (1): 26-29.
- DATTA R. K. (1984) Improvement of silkworm races in India. *Sericologia* 24 (3): 393-415.
- GAMO T. (1976) Recent concepts and trends in silkworm breeding. *Farming Japan* 10 (6): 11-22.
- GAMO T., HIRABAYASI T. (1983) Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallel cross in silkworm, *Bombyx mori* L. *Jap. J. breed.* 33 (2): 178-190.
- HE YI, SINE Y-H, JIANG D-X, PING DUI (1991) Breeding of the silkworm variety for summer and autumn rearing "Xuhua", "Qixing" and their hybrids. *Canye Kexue* 17 (4): 200-207.
- HARADA C. (1961) On the heterosis of quantitative characters in silkworm. *Bull. Seric. Expt. Sta.* 17 (1): 50-52.
- HIROBE T. (1968) Evolution differentiation and breeding of the silkworm - the silk road, past and present. *Genetics in Asian countries. XII Int. Cong. Genet.* p 25-36.
- KOBARI K., FUJIMOTO N. (1966) Studies on the selection of cocoon filament length and cocoon filament size in *Bombyx mori* L. *Nissenzatsu* 35 (6): 427-434.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. CSR & TI Bull. no. 2, Central Silk Board, 1-23.
- KRISHNASWAMI S. (1983) Evolution of new bivoltine races for traditionally multivoltine areas of South India. *Indian Silk* 22 (1): 3-11.
- KURASAWA H. (1968b) Selection of the quantitative cocoon characters in the silkworm. II. Changing of cocoon characters with selection of weight of cocoon layer and cocoon layer ratio. *J. Seric. Sci. Jap.* 37 (1): 51.
- MANO Y. (1994) Comprehensive report on silkworm. Submitted to Central Silk Board, Bangalore PP 1-180.
- MANO Y., TANIGUCHI M., KATO M. (1982) On the breeding of auto-sexing silkworm races, N₁₄₀, C₁₄₀. *Bull. seric. Expt. Stn.*, 18 (5): 667-690.
- MANO Y., NISHIMURA M., KATO M., NAGAYASU K. (1988) Breeding of an autosexing silkworm race N₁₄₀ x C₁₄₅. *Bull. Seric. Expt. stn.*, 30 (5): 753-785.
- MANO Y., ASAKA K., IHARA O., NAKAGAWA H., HIRABAYASHI T. (1991) Breeding and evaluation of adaptability of the silkworm *Bombyx mori* L., to the new low cost artificial diet, LPY lacking of mulberry leaf powder. *Bull. Nat. Inst. Seric. Ent.* 3: 31-56.
- MANO Y., NIRMAL KUMAR S., BASAVARAJA H. K., MAL REDDY N., DATTA R. K. (1993) A new method to select promising silkworm hybrid combination. *Indian Silk*. 30 (10): 53.
- MANO Y., DATTA R. K., MAL REDDY N., BASAVARAJA H. K., NIRMAL KUMAR S., SURESH KUMAR N. (1994) Potentiality of Indian and Japanese hybrids. *Indian Silk*. 33 (2): 5-7.
- NARASIMHANNA M., CHANDRASEKARAI AH, GEETHADEVI R. G., PRABHA G. (1976) Ecogenetic attributes of the newly evolved bivoltine hybrid 'Nandi' in *Bombyx mori* L. *Proc. Dunn-Dobzhansky Symp. Genet.* 379-386.
- RAJU P. J., KRISHNAMURTHY N. B. (1993) Breeding of two bivoltine MG511 and MG512 for silkworm *Bombyx mori* L. for high viability and silk productivity. *Sericologia*. 33 (4): 577-587.
- SREERAMA REDDY G., RAJU P. J., MARIBASETTY V. G. (1992) Heterosis and its application in silkworm *Bombyx mori* L. *Indian Soc. Life Sci. Manas Pub., Kanpur, Up, India.* 205-222.
- TRAG A. R., KANILI A. S., MALIC G. N., KUKILOOFA (1992) Evolution of high yielding bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) genotypes. *Sericologia*. 32 (2): 321-324.
- TANAKA Y., OHI H. (1994) On the breeding and characteristics of a polyphagous silkworm race "Hitachi Nishiki" for summer and autumn rearing. *Rep. Silk Sci. Res. Inst.*, No 42, 27-40.

MISE AU POINT DE NOUVEAUX HYBRIDES BIVOLTINS PRODUCTIFS CSR₂ × CSR₄ ET CSR₂ × CSR₅

R.K DATTA, H.K. BASAVARAJA, N. MAL REDDY, S. NIRMAL KUMAR, M.M.
AHSAN, N. SURESH KUMAR & M. RAMESH BABU

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

Un programme de breeding a été entrepris en utilisant deux hybrides japonais à savoir *Shunrei* × *Shogetsu* et BN₁₈ × BCS₂₅ et une lignée bivoltine populaire indienne, NB₄D₂ dans le but de mettre au point des lignées/hybrides bivoltins robustes du ver à soie *Bombyx mori* L. adaptés aux conditions tropicales. Les lignées CSR₂ filant des cocons ovales blancs et CSR₅ filant des cocons blancs cintrés ont été isolées à partir de l'hybride commercial japonais *Shunrei* × *Shogetsu* par inbreeding répété associé à une sélection, tandis que CSR₄ filant des cocons cintrés blancs a été obtenue à partir de l'hybride japonais BN₁₈ × BCS₂₅ croisé à NB₄D₂. Après leur fixation, ces lignées et d'autres lignées nouvellement mises au point ont été soumises à une étude hybride, en utilisant un nombre important de combinaisons hybrides en laboratoire et évaluées grâce à la méthode de l'Indice d'Évaluation. Les hybrides, c'est à dire, CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅ s'avèrent prometteurs. Les hybrides CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅ enregistrent une survie de 96,5 et 97,1 %, un poids de coque de 46,5 et de 48,7 cg, une richesse soyeuse de 23,5 et de 24,1 %, un pourcentage de soie grège de 20 et 20,5 %, une longueur de filament de 1147 et 1278 m et un rendement à la bassine de 5 et 4,9 kg, respectivement, tandis que l'hybride témoin (KA × NB₄D₂) enregistre une survie de 93,8 %, un poids de coque de 40,7 cg, une richesse soyeuse de 20,5 %, un pourcentage soie grège de 17,2 %, une longueur de filament de 1035 m et un rendement à la bassine de 5,8. Les nouveaux hybrides ont une netteté au-dessus de 94,4 comparée à 93,3 chez l'hybride témoin. Ces hybrides ont reçu l'autorisation d'exploitation commerciale en 1997 par le Central Silk Board, sur la base des résultats obtenus dans dix centres de test situés dans des régions variées.

INTRODUCTION

La synthèse de nouvelles combinaisons de gènes par une technique conventionnelle de lignage est l'un des outils les plus importants pour exploiter le phénomène de vigueur hybride chez le ver à soie *Bombyx mori* L. (Harada, 1961). Une hybridation systématique associée à des procédures de sélection appropriées ont permis de réunir les principaux traits économiques désirés de lignées choisies et de mettre au point des génotypes de constitution et d'expression désirables (Hirobe, 1968; Mano et coll., 1982; Sreerama Reddy et coll., 1992; Tanaka et Ohi, 1994). Compte tenu de cela, l'hybridation de lignées de vers à soie avec des constitutions génétiques différentes peut se faire soit en croisant deux ou quatre lignées parentales en fonction des traits que le sélectionneur désire introduire pour l'amélioration de la productivité (Mano et coll., 1988).

Le concept de breeding de lignées bivoltines en Inde a été initié par Harada (Anonyme, 1955) à Kalimpong. Il a isolé une souche de type chinois (larve uniforme et cocon ovale) Kalimpong A (KA) qui est utilisée comme un des composants pour la production d'hybrides commerciaux. De même, l'isolement de lignées a été commencée dans les années 1970 à partir d'hybrides commerciaux provenant du Japon. Cela a permis l'obtention de trois souches bivoltines, en l'occurrence, NB₄D₂, NB₇ et NB₁₈ (Narasimhanna et coll., 1976; Krishnaswami, 1983). De même, CC₁ et CA₂ ont aussi

été sélectionnés au CSRTI de Mysore (Datta, 1984). Plus tard, de nombreuses lignées bivoltines ont été mises au point par plusieurs sélectionneurs en Inde (Trag et coll., 1992 ; Raju et Krishnamurthy, 1993). Cependant, depuis les 15 dernières années la richesse soyeuse des hybrides bivoltins demeure constante à 20 % et l'obtention de richesse soyeuse du cocon sur le marché commercial du cocon est de l'ordre de 18 %. Cela rend les récoltes bivoltines peu attirantes pour les éleveurs et les filateurs surtout quand ils obtiennent une teneur en soie similaire pour les hybrides polyvoltin $\times$ bivoltin. Bien qu'il y ait eu un bond en avant de la production de soie de mûrier pendant les trois dernières décennies en Inde, la qualité de la soie est mauvaise par rapport aux critères internationaux, parce que la plus grande partie de la production de soie vient d'hybrides polyvoltin $\times$ bivoltin. Il est donc essentiel que les stratégies de lignage se dirigent vers la mise au point de souches/hybrides bivoltins, au taux de survie, à la richesse soyeuse et à la quantité de soie brute élevés avec une soie de bonne qualité pour l'exploitation commerciale.

Compte tenu de cela, des essais ont été entrepris pour mettre au point des lignées/hybrides bivoltins productifs avec un taux de récupération et de qualité de soie élevés.

MATERIELS ET METHODES

Dans notre étude, deux hybrides bivoltins japonais, c'est à dire Shunrei $\times$ Shogetsu et BN₁₈ $\times$ BCS₂₅ et la lignée populaire indienne NB₄D₂ sont utilisés comme matériels source de lignage. Le premier hybride est utilisé pour la séparation de la lignée et le dernier comme parent mâle avec NB₄D₂ pour le lignage en croisement de retour. L'élevage se fait en masse. Les larves sont élevées d'après les techniques standard recommandées par Krishnaswami (1978).

Méthodes de sélection et de lignage :

CSR2 (Lignée ovale) :

La lignée CSR2 a été mise au point à partir de l'hybride commercial japonais Shunrei $\times$ Shogetsu. La F₁ a été élevée en masse en novembre-décembre 1992. Les larves de cet hybride sont marquées et filent des cocons blancs de forme intermédiaire. On procède à la sélection des cocons sur la base de la taille et de l'aspect compact pour la continuation des générations suivantes. En F₂ (ségregants transgressifs), les larves marquées et à cocons cintrés sont séparées des larves uniformes à cocons ovales des lignées de breeding. Les cocons sélectionnés sur leur mérite individuel sont rassemblés et accouplés en masse. A partir de la F₃, on a recours à l'élevage cellulaire. Le lot dont la performance est la meilleure pour la viabilité, la forme des cocons, le rendement, les caractères des cocons et les caractères de dévidage est sélectionné. Les individus qui sont au-dessus de la moyenne du lot sont sélectionnés pour les générations suivantes. Au cours du lignage, on accorde de l'importance à une viabilité, une richesse soyeuse, un pourcentage de soie grège et une qualité (netteté) de soie élevés. Le processus de breeding de CSR₂ est présenté dans la Fig. 1. Les caractères de dévidage comme la longueur du filament, le titre, le pourcentage de soie brute, la netteté, la perte au décreusage sont considérés dans chaque génération pour engendrer la génération suivante.

Caractéristiques de CSR₂ :

Les larves sont uniformes et de couleur blanc bleuté. Les cocons sont blancs et ovales avec des grains fins. La durée larvaire est autour de 24 jours. La richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège, la longueur du filament et la netteté sont bons.

CSR4 (Lignée cintrée) :

La lignée CSR4 a été mise au point à partir de la lignée indienne populaire NB₄D₂ en la croisant avec l'hybride bivoltin BN₁₈ $\times$ BCS₂₅. On a réalisé un élevage de masse en F₁. A partir de F₂ on a recours à l'élevage cellulaire. Deux croisements de retour successifs avec NB₄D₂ sont réalisés en F₂ et F₃ pour fixer la forme du cocon. Au cours du lignage, on prend principalement en considération la

viabilité, le rendement en cocons, une richesse soyeuse, et une qualité de soie élevées et l'accouplement est réalisé entre femelles et mâles des cocons dont le poids, le poids de la coque et la richesse soyeuse sont au-dessus de la moyenne. Le processus de lignage de CSR₄ est présenté dans la Fig. 2.

Caractéristiques de CSR₄ :

Les larves sont uniformes et de couleur blanc bleuté. Les cocons sont blancs et cintrés avec des grains moyens. La durée larvaire est autour de 24 jours. Le pourcentage de richesse soyeuse, la longueur du filament et la netteté sont bons.

CSR₅ (Lignée cintrée) :

La lignée CSR₅ a été mise au point comme CSR₂ à partir de l'hybride commercial japonais Shunrei × Shogetsu. En F₂ (ségréants transgressifs) les larves marquées à cocons cintrés sont séparées des larves uniformes à cocons cintrés pour réaliser les lignées de breeding. Les cocons sélectionnés sur leur mérite individuel sont regroupés et accouplés en masse. A partir de la F₃, on a recours à l'élevage cellulaire. Le lot présentant les meilleures performances en termes de forme du cocon, de viabilité, de rendement du cocon, de caractères du cocon et de dévidage est sélectionné. Les individus qui sont au-dessus de la moyenne du lot sont sélectionnés pour les générations suivantes. Au cours du lignage, on tient principalement compte de la robustesse (la viabilité), du rendement en cocons, d'une richesse soyeuse et d'une qualité de soie élevées. Le processus de breeding de CSR₅ est présenté dans la Fig. 3.

Caractéristiques de CSR₅ :

Les larves sont uniformes et blanc bleuté. Les cocons sont blancs crèmeux et cintrés avec des grains moyens. La durée larvaire est autour de 24 jours. Le poids de la coque, la richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège, la longueur du filament et la netteté sont bons.

Après la fixation, ces lignées et d'autres lignées nouvellement élaborées sont soumises à une étude des hybrides en laboratoire dans des conditions environnementales optimum pour la pleine expression du potentiel des génotypes. Cent quatre vingt six hybrides ont été évalués d'après la Méthode de l'Indice d'Évaluation (Mano et coll., 1993 et Mano, 1994). On trouve que les hybrides, CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅ sont prometteurs.

Caractéristiques des nouveaux hybrides CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅ :

Les larves sont d'un blanc bleuté et uniformes. Les cocons sont blancs et ont une forme intermédiaire entre ovale et cintrée (Figs. 4 et 5). La période larvaire est autour de 23-24 jours. Les principaux caractères de ces hybrides sont les suivants : taux de survie élevé, richesse soyeuse élevée, longueur plus importante du filament et une qualité de soie grège élevée. Les hybrides sont robustes. Cela rend l'élevage facile pour les fermiers si les conditions d'hygiène sont bonnes. Ces hybrides sont recommandés pour l'élevage pendant les saisons favorables, c'est à dire de août à février avec des fermiers sélectionnés disposant de mûriers irrigués.

On a fait des observations sur les divers paramètres comme la survie, le rendement en cocons / 10 000 larves, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège, la longueur du filament, le titre du filament, la netteté, la dévidabilité et le rendement à la bassine. De plus, la perte au décreusage et la déviation du titre du filament de ces hybrides ont aussi été mesurés. L'amélioration des caractères variés chez les hybrides/lignées mises au point par rapport aux lignées témoins (KA et NB₄D₂) / hybride (KA × NB₄D₂) est calculé comme suit :

$$\frac{\text{Valeur de la lignée / hybride mis au point} - \text{Valeur de la lignée / hybride témoin}}{\text{Valeur de la lignée / de l'hybride témoin}} \times 100$$

RESULTATS

Lignées parentales :

Les valeurs moyennes en fonction des générations pour dix traits économiques chez les lignées de breeding CSR₂, CSR₄ et CSR₅ sont présentées dans les tableaux I, II et III respectivement. Les valeurs moyennes et l'amélioration par rapport aux lignées témoin KA et NB₄D₂ sont présentées dans les tableaux IV et V.

L'observation des données pour le pourcentage de survie montre qu'il y a une légère baisse en F₅ chez CSR₂ (78,30 %) et CSR₅ (71,24 %) et en F₇ chez CSR₄ (73,66 %). Le pourcentage de survie maximum est enregistré en F₁₀ chez CSR₂ (94,88 %), en F₄ chez CSR₄ (95,91 %) et en F₁₃ chez CSR₅ (90,23 %). Par contre l'amélioration observée par rapport à KA est de 19,3 % chez CSR₂. L'amélioration par rapport à NB₄D₂ chez CSR₄ (0,4 %) est marginale et il n'y a pas d'amélioration chez CSR₅. On observe un rendement maximum en poids de cocons / 10 000 larves en F₂ chez CSR₅ (19,8 kg) et CSR₄ (20,5 kg). Cependant, il y a un déclin en F₇ chez ces lignées (CSR₂ = 14,8 kg, CSR₄ = 13,8 kg et CSR₅ = 12,1 kg). L'amélioration du pourcentage par rapport à KA est de 17,1 chez CSR₂, tandis qu'aucune amélioration n'est observée en F₂ chez CSR₄ et CSR₅ par rapport à la lignée témoin NB₄D₂. Le poids maximum du cocon est enregistré en F₂ chez CSR₂ et CSR₅ (2,25 g) et en F₁ chez CSR₄ (2,20 g). Le poids minimum du cocon est observé en F₇ chez CSR₂ (1,66 g) et CSR₅ (1,65 g) et en F₆ chez CSR₄ (1,63g). Les données indiquent qu'il n'y a pas d'amélioration du poids du cocon pour ces lignées par rapport aux lignées témoins KA et NB₄D₂. Le poids maximum de la coque est enregistré en F₂ chez CSR₂ et CSR₅ (56,5 cg) et en F₁ chez CSR₄ (51,6 cg). L'amélioration maximum du pourcentage par rapport à KA est observée chez CSR₂ (42,9) tandis que chez CSR₄ et CSR₅, l'amélioration en pourcentage par rapport à NB₄D₂ est respectivement de 6,4 et 12. La richesse soyeuse chez CSR₂ est supérieure à 24 à partir de la F₁ mais dans le cas de CSR₄ et CSR₅, elle est comprise respectivement entre 20,4 et 23,4 % et entre 22,8 et 25,1 %. La richesse soyeuse la plus élevée est de 25,8 en F₁₁ chez CSR₂, en F₁ chez CSR₄ (23,4 %) et en F₂ chez CSR₅ (25,1 %). L'amélioration maximum est observée chez CSR₂ (26,4 %) suivie par CSR₅ (14,9 %) et CSR₄ (7 %).

Le pourcentage maximum de soie grège est enregistré en F₆ chez CSR₂ (20,1 %), en F₁₀ chez CSR₄ (19,7) et en F₆ chez CSR₅ (20,3). Il est compris entre 17,5 et 20,1 % chez CSR₂, entre 16,4 et 19,7 % chez CSR₄ et entre 17,4 et 20,3 % chez CSR₅. L'amélioration par rapport aux lignées témoins est de 26,4 % chez CSR₂, 0,9 % chez CSR₄ et 7,9 % chez CSR₅. La longueur du filament varie entre 1048 et 1179 m chez CSR₂, entre 905 et 1436 m chez CSR₄ et entre 962 et 1179 m chez CSR₅. Il y a une tendance à la baisse de la longueur du filament à partir de F₁ chez CSR₄ et à partir de F₂ chez CSR₅ mais elle se stabilise en F₈ chez CSR₄ et en F₉ chez CSR₅. Cependant, chez CSR₂, cette tendance n'est pas observée. Toutes les nouvelles lignées enregistrent une amélioration pour ce caractère par rapport aux lignées témoin. L'amélioration est de 22,8 % chez CSR₂, de 9,5 % chez CSR₄ et de 13,5 % chez CSR₅. Le titre maximum est observé en F₃ chez CSR₂ (3,69d), en F₁₀ chez CSR₄ (3,32d) et en F₆ chez CSR₅ (3,38d). La dévidabilité est comprise entre 77 et 84 % chez CSR₂, entre 62 et 84 % chez CSR₄ et entre 69 à 86 % chez CSR₅. La netteté maximum est enregistrée en F₁₂ chez CSR₂ (92,8 p) et CSR₄ (93,3 p) et en F₁₃ chez CSR₅ (94,5).

Hybrides :

La performance en laboratoire des nouveaux hybrides est présentée dans le Tableau VI.

Les hybrides CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅ enregistrent une survie moyenne respectivement de 96,5 et 97,1 % par rapport à l'hybride témoin KA × NB₄D₂ (93,8 %). L'amélioration chez CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅ est respectivement de 2,7 % et 3,3 %. Le rendement en cocons de 19,41 kg et 19,74 kg/10 000 larves est enregistré chez CSR₂ × CSR₄ et chez CSR₂ × CSR₅ respectivement contre 19,09 kg pour l'hybride témoin. CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅ enregistrent un poids de cocon respectivement de 1,978 et de 2,025 g tandis que l'hybride témoin enregistre un poids de cocon de 1,988 g. Le poids maximum de la coque est observé chez CSR₂ × CSR₅ suivi par CSR₂ × CSR₄

(46,5 cg) contre 40,7 cg pour le témoin. $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ enregistrent une amélioration (14,2 et 19,6 %) par rapport au témoin. La richesse soyeuse chez $CSR_2 \times CSR_4$ est de 23,5 et chez $CSR_2 \times CSR_5$ de 24,1 % respectivement comparée à l'hybride témoin (20,5 %). Une amélioration de 14,7 et 17,8 % par rapport au témoin est observée chez $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ respectivement.

La quantité de soie grège chez $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ est respectivement de 20 et 20,5 % contre 17,2 % chez le témoin. $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ enregistrent une amélioration de 16,3 et 19 % respectivement par rapport au témoin. La longueur du filament chez $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ est respectivement de 1147 et 1218 m par comparaison à l'hybride témoin (1035 m). L'amélioration observée par rapport au témoin est de 10,7 et 17,6 % respectivement chez $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$. Le titre du filament enregistré pour $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ est de respectivement 3,18 et 3,08 d contre 3,0 d chez l'hybride témoin. $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ enregistrent une dévidabilité respectivement de 85 et 79 % par rapport au témoin (81 %). $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ donnent une netteté respectivement de 94,4 et 95,3 p contre 93,3 p pour le témoin. Le rendement à la bassine chez $CSR_2 \times CSR_4$ et chez $CSR_2 \times CSR_5$ est respectivement de 5 kg et 4,88 kg contre 5,81 kg pour le témoin. Les hybrides $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ enregistrent une perte au décreusage respectivement de 24,4 et 23,8 % contre 24,8 % chez l'hybride témoin. La régularité du titre du filament de soie de ces hybrides est présentée dans la Fig. 6. Les hybrides $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ donnent une déviation du titre du filament la moins importante.

Tests au Regional Sericultural Research Station (RSRS) :

Après l'évaluation systématique en laboratoire, les hybrides $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ ont été testés au RSRS du *Central Silk Board* en parallèle avec l'hybride témoin. Les performances sont présentées dans le tableau VII. L'examen des données indique que $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ ont de meilleures performances que l'hybride témoin pour ce qui est du poids du cocon, de la richesse soyeuse, du pourcentage de soie grège et du rendement à la bassine. De manière intéressante, le rendement à la bassine enregistré pour $CSR_2 \times CSR_4$ et $CSR_2 \times CSR_5$ est respectivement de 5,2 et 5,0 contre 6,5 pour le témoin. L'amélioration observée chez $CSR_2 \times CSR_4$ en ce qui concerne le poids du cocon est de 22,9 % ; pour la richesse soyeuse de 20,3 % et pour la soie grège de 23,2 %, tandis que l'amélioration chez $CSR_2 \times CSR_5$ est respectivement de 25,1, de 22,6 et de 27,1. Cependant, l'amélioration n'est pas significative pour les autres caractères comme la survie, le rendement en cocons et la longueur du filament.

Tests d'autorisation dans différents centres test :

Compte tenu de la performance de ces hybrides à la fois en laboratoire et au RSRS, ils ont été soumis à un test d'autorisation de race conçu et mis en oeuvre au *Central Silk Board* (CSB), Gouvernement indien en 1996. Ces hybrides sont testés dans 10 centres situés dans différentes régions au printemps et à l'automne. La moyenne des résultats de ces tests pour les hybrides dans tous les centres dans le cadre du test d'autorisation est présentée dans le tableau VIII. La performance générale de ces hybrides indique leur supériorité par rapport au témoin pour quatorze caractères sur les dix huit testés.

DISCUSSION

Les hybrides bivoltins à usage commercial sont très peu nombreux, de plus l'obtention de soie est très limitée et incalculable. Comme on s'intéresse de plus en plus à la vulgarisation de la sériciculture bivoltine dans les conditions indiennes tropicales / subtropicales, il est devenu impératif de mettre au point des hybrides bivoltins productifs et de qualité pour les utiliser à des fins commerciales. Dans ce but, des travaux de breeding ont été entrepris pour améliorer les caractères comme la quantité de soie et la qualité de la soie en mettant au point des bivoltins productifs. Dans cet objectif, des hybrides japonais, dont on connaît la productivité et la qualité de soie élevées ont été utilisés comme matériel

de lignage (Mano et coll., 1994). De plus, on a réalisé un croisement de retour (pour CSR₄) aux générations du début, suivi par un élevage consanguin et une sélection de manière à stabiliser la forme du cocon, la viabilité et les caractères productifs dans les descendance.

Une approche systématique du lignage en concevant un protocole expérimental associé à la sélection des traits désirables chez les hybrides a permis aux sélectionneurs chinois et japonais de mettre au point des lignées productives et d'obtenir un progrès remarquable pour l'amélioration de plusieurs traits quantitatifs et qualitatifs de valeur économique (Harada, 1961 ; Gamo, 1976 ; Hirobe, 1968 ; Mano et coll., 1988 et 1991 ; He Yi et coll., 1991 ; Chen He rui et coll., 1994 ; Tanaka et Ohi, 1994). Il en a résulté que les caractères comme le poids du cocon et le poids de la coque ont répondu à la sélection (Kurasawa, 1968b et Gamo et Hirabayashi, 1983). On sait que le croisement de deux souches au patrimoine génétique différent produit une hétérozygotie dans tous les caractères hérités de manière polygénétique et donne une population hétérozygote sur laquelle on peut procéder à une sélection afin de sélectionner les lignées désirables et de les fixer dans un génotype adapté. Ainsi, on a pris très grand soin d'élever des populations de taille plus importante dans les premières générations (F₁ et F₂) pour s'assurer d'un champ plus large pour l'expression des lignées désirées et de leur sélection pendant des générations.

Les données présentées dans les tableaux IV et V indiquent clairement que la lignée ovale CSR₂ surpasse la lignée témoin KA pour des caractères comme la survie, le rendement en cocons, le poids de la coque, la richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège et la longueur du filament. Chez les lignées cintrées (CSR₄ et CSR₅) on observe une amélioration par rapport à la lignée cintrée déjà existante NB₄D₂ pour les caractères comme le poids de la coque, la richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège et la longueur du filament. L'implication de ces deux nouvelles lignées c'est à dire CSR₄ et CSR₅ avec la lignée ovale CSR₂ par rapport à l'amélioration de nombreux caractères quantitatifs et qualitatifs indique la supériorité de ces nouvelles lignées comme le prouve l'amélioration de plusieurs caractères quantitatifs et qualitatifs variés chez les hybrides à savoir, CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅. Comme les lignées parentales, les nouveaux hybrides surpassent aussi l'hybride témoin pour de nombreux caractères quantitatifs et qualitatifs. Bien qu'il n'y ait pas une grande amélioration de la survie et du rendement en cocons chez les hybrides nouveaux par rapport à l'hybride témoin (KA × NB₄D₂), on observe une amélioration du poids de la coque, de la richesse soyeuse, de la quantité de soie grège, de la longueur du filament et du rendement à la bassine chez CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅. De plus, la confirmation de ces résultats pour ces nouveaux hybrides au RSRS tout comme au niveau du sélectionneur indique que ces hybrides sont robustes.

Chez le ver à soie, on a observé que la sélection d'un caractère entraîne des changements corrélés des autres caractères quantitatifs d'importance économique (Kobari et Fujimoto, 1966). Par exemple, les caractères de survie et de productivité, d'une importance économique élevée, sont corrélés de manière négative l'un avec l'autre. Comme on a pu le voir dans cette étude de lignage, en gardant un poids du cocon équivalent à celui de l'hybride témoin, les traits de productivité (poids de la coque, richesse soyeuse, soie grège et longueur du filament) et les traits qualitatifs (netteté) se sont améliorés. Pour la première fois, le *Central Sericultural Research and Training Institute*, Mysore a mis au point ces hybrides à la quantité et à la qualité de soie plus élevées en adoptant un nouveau concept de stratégie de lignage (Basavaraja et coll., 1994). D'après les résultats des tests obtenus dans les centres de test, le *Central Silk Board* a autorisé la commercialisation de ces hybrides, en l'occurrence CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅. Comme ces hybrides (CSR₂ × CSR₄ et CSR₂ × CSR₅) se caractérisent par leur productivité élevée, ils sont recommandés pour l'élevage seulement pendant les saisons favorables (septembre à février dans l'Inde du sud et pendant le printemps dans les zones tempérées /subtropicales) par des fermiers sélectionnés disposant de mûraies irriguées. De plus, des hybrides tolérant une température élevée ont été mis au point pour convenir aux zones/saisons à température élevée. Pour le moment, ils sont testés dans les centres situés dans des régions différentes dans le but d'être autorisés.

EFFECT OF PLANT DENSITY ON GROWTH, YIELD AND LEAF QUALITY IN TRIPLOID MULBERRY

S.G.DOSS, K. VIJAYAN*, M.S. RAHMAN, K.K. DAS, S.P. CHAKRABORTI & B. N. ROY

Mulberry Breeding and Genetics section, Central Sericultural Research and Training Institute,
Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

A field experiment was conducted to study the effect of plant densities on leaf yield and its attributing characters along with quality parameters of five triploid mulberry varieties. Leaf yield was higher in 60 × 60 cm spacing whereas leaf quality was better in 150 × 150 cm spacing. Variety S1708 was found performing equally well in all spacing. From this study, it has been concluded that unlike diploid mulberry varieties the optimum spacing for triploid mulberry variety is 60 × 60 cm which may be adopted for cultivation of triploid mulberry varieties for better leaf yield.

Keywords : Mulberry, triploid, plant density, leaf yield.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* spp.) is an important plantation crop grown primarily for foliage used to rear the silkworm *Bombyx mori* L. It grows in different climatic conditions ranging from tropic to temperate. Traditionally, mulberry is propagated through stem cuttings. Though the plant can grow as tree, for convenience to pluck leaf and to suit the growth period to silkworm rearing seasons, it is being maintained as low (10 cm - 20 cm) to high bush (90 cm - 100 cm) through continuous training.

The economic return in sericulture is largely decided by the quality and quantity of mulberry leaf produced from a unit area as the production cost of mulberry leaf alone covers more than 60 % of the total expenditure of the cocoon production. Hence, improved mulberry varieties with high yield potential along with suitable agronomic practices are essential to sustain the profitability in sericulture. Triploid mulberry varieties seem to be an attractive choice as it has been found that the triploids are superior to the traditional diploids in most economically important characters such as survival percentage (Tikader *et al.*, 1996), leaf yield (Dwivedi, 1994; Sikdar and Jolly, 1995), chemical components (Das and Prasad, 1974) and silkworm feeding quality (Sarkar, 1993). Hence, a large number of triploid mulberry are being developed to meet the growing demand of quality mulberry leaf in India (Vijayan and Chakraborti, 1998).

Like any other crop, determination of optimum plant density per unit area is an important consideration for maximizing the yield in mulberry. Though a few attempts have been made to optimize the plant density of diploid mulberry (Kasivishwanathan and Iyengar, 1970; Krishnaswamy *et al.*, 1970; Kikuchi, 1981; Chaudhury *et al.*, 1991) considering the great differences between the diploid and triploid in nutritional requirement as well as the growth pattern, the present investigation was undertaken with the objective to study the effect of plant density on the important characters so as to optimise the plant density to get maximum yield of good quality leaf to rear bivoltine silkworms in India and other tropical countries.

* To whom the correspondence should be made.

MATERIALS AND METHODS

Five triploid mulberry genotypes developed at Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal were planted in 3 different spacing of 45 × 15 cm (143,518 plants/ha), 60 × 60 cm (26,910 plants/ha) and 150 × 150 cm (4,306 plants/ha) and were arranged in Randomised Block Design with 3 replications. Each replication composed of 25 clones of each variety. Cultural practices were followed as recommended (Roy *et al.*, 1973). Insects (thrips and mites) were controlled by weekly insecticide sprays. Diseases like powdery mildew and leaf rust were controlled by application of fungicide at regular intervals.

Two years after planting data on following parameters were taken for three consecutive years. All the data were recorded on the 60th day after pruning. Number of primary branches was recorded by counting the number of erect and stout branches growing from each stump. The length of the longest shoot was taken as the height of the plant. Nodal distance was calculated on the basis of number of leaves present in one meter length of stem at the middle of the branch. Harvest index was calculated from fresh weight of leaf and twig. Dry weight of 100 mature leaves was measured by oven drying at 80°C for 48 hours. Leaf yield was recorded four times a year synchronising it with the silkworm rearing seasons. After each leaf harvest, the plants were pruned at ground level. Leaf moisture content of the leaf was calculated as reported earlier (Vijayan *et al.*, 1997). Total soluble sugar and protein were measured by following Morris (1948) and Lowry *et al.* (1951).

Bioassay of the leaf was done by feeding the leaf to the silkworm *Bombyx mori* L. For each variety, silkworms were brushed in separate trays making three replications arranged randomly. In each replication 50 worms were used for the experiment. Weight of the fully matured worms was taken just before the spinning. Weight of the single cocoon and the shell-cocoon ratio (%) were calculated by observing 10 cocoons in each replication.

RESULTS AND DISCUSSION

The number of primary branches developed from each variety showed significant variation among the three different spacing as well as among themselves. Highest average number of primary branches (59.33) was observed in plot with less plant density due to wider spacing. This is mainly due to the availability of adequate supply of sunlight, nutrient, CO₂ and water. Kasiviswanathan and Iyengar (1970) also found a similar effect on diploid mulberry varieties. Plant height was higher in closer spacing (140.38). In 60 × 60 cm, the height of the plant was lesser than that in both wider and closer spacing. The greater plant height observed in closer spacing may be due to the partial etiolation of stem resulting from the lack of sufficient sun light. Nodal distance, an undesirable character, was again higher in closer spacing which was indicated by lesser number of leaves per twig. Harvest index on the fresh weight basis, however, did not show any significance among the plants of different population densities. Leaf yield, the most important character, showed very significant variation between the 60 × 60 cm spacing with the other two spacing.

However, it could also be seen that average leaf yield in 45 × 45 cm spacing (29,628 kg/ha/yr) is better than that in 150 × 150 cm spacing (23,013 kg/ha/yr). The average leaf yield in most of the varieties was much less in wider spacing. This decline in leaf yield under wider spacing was due to the reduction in number of plants present per unit area. However, the variety S1708 has yielded equally well in all the spacing, showing the compensatory effect of yield contributing factors like number of branches, shorter nodal distance and higher leaf weight. Hasegawa (1967) also found such relation in varieties with profuse branching capacity.

Table 1. Morphological and leaf yield characteristics of mulberry grown under different plant spacing.

Tableau 1. Caractéristiques morphologiques et de rendement chez le mûrier cultivé avec des espacements différents.

Genotypes	No of branches			Height (cm)			Nodal distance (cm)			Leaf harvest index			Wt of 100 dry leaves (gm)		
Génotypes	Nb de branches			Hauteur (cm)			Distance nodale (cm)			Index de la récolte de feuilles			Poids de 100 feuilles séchées (g.)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
C1726	5.20	16.33	64.33	139.90	113.00	132.66	3.74	2.40	2.75	0.52	0.53	0.48	59.61	63.02	52.12
C1729	4.73	15.00	68.00	132.40	112.00	126.66	3.80	2.67	2.86	0.45	0.51	0.48	51.37	61.42	62.92
C1730	4.13	8.33	41.67	141.20	101.33	127.66	3.72	2.39	2.39	0.52	0.49	0.52	57.58	66.30	55.03
S1635	4.86	16.00	60.33	144.80	112.33	120.33	4.38	2.35	3.67	0.45	0.51	0.46	56.53	56.92	65.96
S1708	5.00	15.00	62.33	143.63	130.66	144.33	4.15	3.23	3.64	0.51	0.51	0.48	60.63	57.02	70.92
Mean / Moyenne	4.78	14.13	59.33	140.38	113.86	130.33	3.96	2.61	3.08	0.49	0.51	0.48	57.14	60.94	61.39
CD at 5 % / D. C. à 5 %															
Spacing / Espacement	3.34			9.64			0.34			NS			NS		
Variety / Variété	2.59			7.47			NS			NS			NS		
Spa X Var	5.78			NS			NS			NS			NS		

A - 15 × 45 cm.

B - 60 × 60 cm.

C - 150 × 150 cm.

Table II. Biochemical properties of mulberry leaves from plants grown in different plant spacing.

Tableau II. Propriétés biochimiques des feuilles de mûriers provenant de plantations à différents espacements.

Genotypes	Leaf yield (kg/ha/yr)			Moisture %			Protein (mg/g fr wt)			Sugar (mg/g fr wt)		
Génotypes	Rendement en feuilles (kg/ha/an)			Humidité %			Protéines mg/g poids frais			Sucres (mg/g poids frais)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
C1726	29,862	33,500	21,839	73.86	78.37	76.75	17.76	13.26	15.44	14.57	26.88	37.00
C1729	28,759	32,600	24,758	73.63	77.94	77.43	23.32	24.21	19.56	19.30	23.99	34.26
C1730	29,337	32,300	18,814	72.75	77.06	76.85	21.38	25.35	21.49	17.83	21.34	37.84
S1635	30,254	35,600	21,075	74.38	78.78	76.86	17.45	24.00	21.81	18.55	28.02	36.57
S1708	29,977	35,700	28,580	72.48	76.60	77.77	21.57	23.17	25.72	21.77	29.24	33.48
Mean	29,638	33,940	23,013	73.42	77.75	77.13	20.30	23.02	20.81	18.14	25.90	35.83
C/D at 5 %												
Spacing Espacement	2885			1.16			NS			1.95		
Variety	NS			NS			3.37			NS		
Spa X Var	NS			NS			NS			4.37		

A: 45 × 45 cm.

B: 60 × 60 cm.

C: 150 × 150 cm.

The biochemical analysis of the leaf showed higher protein and sugar in plants grown under 150 × 150 cm spacing, indicating the superior quality. Chaudhury *et al.* (1991) also found higher protein and sugar in the leaves of plants under wider spacing. Bioassay results also support the above findings that plants in wider spacing have better feeding value. Das *et al.* (1993) reported significant improvement in leaf cocoon ratio and absolute silk content when silkworms were fed on leaves of mulberry grown under wider spacing. However, Sengupta *et al.* (1973) did not find any significance in cocoon quality. Krishnaswamy *et al.* (1970), on the other hand, observed a significant increase in larval and cocoon weight.

Table III. Bioassay results of leaves from mulberry plants grown under different spacing fed to silkworm.

Tableau III. Résultats des essais biologiques sur des feuilles données aux vers à soie provenant de plants de mûriers aux différents espacements.

Genotypes	Wt. of 10 mature larvae (g)			Single cocoon weight (g)			Shell ratio %		
Génotypes	Poids de 10 larves mûres (g)			Poids d'un cocon (g)			Richesse soyeuse %		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
C1726	20.27	20.74	21.29	1.023	0.993	1.053	11.170	11.200	11.360
C1729	19.12	20.10	20.46	0.890	0.937	1.013	11.590	12.010	12.830
C1730	19.37	19.98	20.98	0.930	0.917	1.213	11.397	11.630	11.210
C1635	17.27	17.84	21.33	0.800	0.800	0.893	11.593	11.760	12.220
S1708	18.03	18.88	19.93	0.927	0.947	1.163	12.097	11.920	12.410
Mean	18.81	19.51	20.80	0.914	0.919	1.057	11.569	11.704	12.000
CD at 5 % / Ecart type à 5 %.									
Spacing / Espacement	0.76		0.068				NS		
Variety / Variété	0.98		0.089				0.55		
Spa X Var	NS		NS				NS		

A: 45 × 45 cm. B: 60 × 60 cm. C: 150 × 150 cm.

Since, the economic return in sericulture largely depends on the quality and quantity of mulberry leaves, an optimum spacing is utmost essential for sustaining the profitability in sericulture. In general, the leaf quality in triploids is far better than that in diploids, hence the leaves of triploids are very much suitable for silkworm rearing. Therefore, a spacing which gives higher leaf yield with little negative impact on leaf quality can be considered as an optimum plant density. In this study, it was found that the plant density under 60 × 60 cm spacing gives the best results, hence, the same can be adopted for triploid mulberry cultivation under tropical climatic conditions.

REFERENCES

- CHAUDHURY P.C., SHUKLA P., GHOSH A., MALLIKARJUNA B. AND SENGUPTA K. (1991)
Effect of spacing, crown height and method of pruning on mulberry leaf yield, quality and cocoon yield. Indian J. Seric., 30:46-53.

- DAS P.K., CHOUDHURY P.C., GUPTA Y.K., GHOSH A. AND DATTA R.K. (1993) Effect of different levels of nitrogen, phosphorus and spacings on the growth, yield and nutritional quality of mulberry under rainfed conditions. *Indian J. Seric.* 32:201-207.
- DAS B.C. AND KRISHNASWAMY S. (1965) Some observations on interspecific hybridization in mulberry. *Indian J. Seric.* 4:1-4.
- DAS B.C. AND PRASAD D.N. (1974) Evaluation of some tetraploid and triploid mulberry varieties through chemical analysis and feeding experiment. *Indian J. Seric.* 13:17-22.
- DWIVEDI N.K. (1994) Induced autotriploid in mulberry. *Advances in Plant Science*, 7: 35-40.
- HASEGAWA K.C. (1967) Studies on the relations between population density and yield in the mulberry field. *Bulletin of Seric. Exp. Station Japan*, 22:28-29.
- KASIVISHWANATHAN K. AND IYENGAR M.N.S. (1970) Effect of plant densities, method of leaf harvest and nitrogen fertilization on the leaf yield of irrigated mulberry in Mysore. *Indian J. Seric.* 9:43-48.
- KIKUCHI H. (1981) Ecological studies on planting density of mulberry I: Seasonal variation in dry weight of root, stumps, shoot and leaves. *J. Seric. Japan*, 50:465-471.
- KRISHNASWAMY S., ROY D. AND MUKHERJEE S.K. (1970) Yield and nutritive value of mulberry leaves as influenced by planting system, spacing and frequency of pruning. *Indian J. Seric.* 9:38-42.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. AND RANKLED R.J. (1951) Protein measurement with foline-phenol reagent. *J. of Biochem.* 193:265-275.
- MORRIS D.L. (1948) Quantitative determinations of carbohydrates with dry wood anthrone reagent. *Science*, 107:254-255.
- RAY D., MONDAL L.N., PAI A.K. AND MONDAL S.K. (1973) Effect of NPK on farmyard manure on the yield and nutritive value of mulberry leaf. *Indian J. Seric.* 12:7-12.
- SARKAR A. (1993) Effect of feeding different races of silkworm (*Bombyx mori*) with mulberry (*Morus indica* L.) leaves varying in ploidy level. *Sericologia*, 33:25-34.
- SENGUPTA K., MUKHERJEE S.K., SIKDAR A.K., MUSTAFI J.C. AND SENGUPTA D. (1973) A co-ordinated study on the effect of variety, spacing in cultivation and levels of nitrogen fertilization of mulberry on cocoon yield and cocoon characters of multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. *Ind. J. Seric.* 12:39-45.
- SIKDAR A.K. AND JOLLY M.S. (1995) Induced polyploidy in mulberry (*Morus* spp.) II: production of triploids and their evaluation. *Bulletin of Sericultural Research*, 6:39-46.
- TIKADER A., VIJAYAN K., ROY B.N. AND PAVAN KUMAR T. (1996) Studies on propagation efficiency of mulberry (*Morus* spp.) at ploidy level. *Sericologia*, 36:345-349.
- VIJAYAN K., CHAUHAN S., DAS N.K., CHAKRABORTI S.P. AND ROY B.N. (1997) Leafy yield component combining abilities in mulberry (*Morus* spp.). *Euphytica*, 98:47-52.
- VIJAYAN K. AND CHAKRABORTI S.P. (1998) Breeding for triploid mulberry varieties in India. *Indian J. Seric.* 37:1-4.

EFFET DE LA DENSITE DE PLANTATION SUR LA CROISSANCE, LE RENDEMENT ET LA QUALITE DE LA FEUILLE CHEZ LE MURIER TRIPLOIDE

S.G. DOSS, K. VIJAYAN*, M.S. RAHMAN, K.K. DAS, S.P. CHAKRABORTI & B.N. ROY

Mulberry Breeding and Genetics Section, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, Inde.

Une expérience sur le terrain a été réalisée pour étudier l'effet de différentes densités de plantation sur le rendement en feuilles et ses caractères associés et sur les paramètres de qualité de cinq variétés de mûriers triploïdes. Le rendement en feuilles est plus élevé avec l'espacement de 60 × 60 cm tandis que la qualité de la feuille est meilleure avec l'espacement de 150 × 150 cm. Il s'avère que la variété S1708 donne d'aussi bons résultats pour tous les espacements. D'après cette étude, nous avons conclu qu'à la différence des variétés de mûrier diploïdes, l'espacement optimum pour les variétés de mûriers triploïdes est de 60 × 60 cm. Cet espacement pourrait être adopté pour la culture de variétés de mûrier triploïdes pour obtenir un meilleur rendement.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* spp.) est une plante importante cultivée en premier lieu pour son feuillage que l'on utilise dans l'élevage du ver à soie *Bombyx mori* L. Il pousse dans des conditions climatiques diverses, allant de tempérées à tropicales. De manière traditionnelle, le mûrier est multiplié par bouturage. Bien que la plante puisse devenir un arbre, elle est maintenue grâce à une formation continue en buissons petits (10 cm - 20 cm) et hauts (90 cm - 100 cm) pour faciliter le ramassage des feuilles et pour adapter la période de croissance aux saisons d'élevage des vers à soie.

Le profit économique en sériciculture dépend en grande partie de la qualité et de la quantité de feuilles de mûrier produites par surface unitaire puisque le coût de production du mûrier représente à lui seul plus de 60 % des dépenses totales dans la production de cocons. Ainsi, il est essentiel d'avoir des variétés de mûrier améliorées avec un haut potentiel de rendement et des pratiques de culture adaptées pour assurer le profit en sériciculture. Les variétés de mûrier triploïdes semblent être un choix intéressant car les triploïdes sont supérieurs aux diploïdes traditionnels en ce qui concerne tous les caractères économiques importants comme le pourcentage de survie (Tikader et coll., 1996), le rendement en feuilles (Dwivedi, 1994 ; Sikdar et Jolly, 1995), les composants chimiques (Das et Prasad, 1974) et la qualité de la nourriture des vers à soie (Sarka, 1993). De nombreux mûriers triploïdes sont ainsi mis au point pour répondre à la demande croissante en feuilles de mûrier de qualité en Inde (Vijayan et Chakraborti, 1998).

Comme pour n'importe quelle autre culture, la détermination de la densité de plantation optimum est un élément important pour maximiser le rendement du mûrier. Bien qu'il y ait eu quelques essais pour optimiser la densité de plantation du mûrier diploïde (Kasivishwanathan et Iyengar, 1970 ; Krishnaswamy et coll., 1970 ; Kikuchi, 1981 ; Chaudhury et coll., 1991), compte tenu des grandes différences en besoins nutritionnels entre les diploïdes et les triploïdes, et aussi du type de croissance,

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

l'étude présente a été entreprise afin d'étudier l'effet de la densité de plantation sur les caractères importants de manière à optimiser la densité de plantation pour obtenir le rendement maximum en feuilles de qualité pour élever des vers à soie bivoltins en Inde et dans d'autres pays tropicaux.

MATERIELS ET METHODES

Cinq génotypes de mûrier triploïdes mis au point au *Central Sericultural Research and Training Institute*, Berhampore, West Bengal, ont été plantés selon trois espacements différents de 45 × 15 cm (143 518 plants/ha), 60 × 60 cm (26 910 plants /ha) et 150 × 150 cm (4 306 plants/ha) et ont été disposés en blocs aléatoires en trois répétitions. Chaque répétition comprend 25 clones de chaque variété. Les pratiques de culture recommandées ont été suivies (Roy et coll., 1973). La lutte contre les insectes (thrips et mites) a été effectuée grâce à des vaporisations d'insecticides hebdomadaires. Des fongicides ont été administrés à des intervalles réguliers pour prévenir les maladies comme le mildiou poudreux et la rouille de la feuille.

Deux ans après la plantation, les paramètres ont été mesurés pendant trois années consécutives. Toutes les données sont enregistrées 60 jours après la taille. Le nombre de branches principales a été obtenu en comptant le nombre de branches vigoureuses et droites poussant à partir de chaque souche. La longueur de la pousse la plus longue a été considérée comme la hauteur de la plante. La distance nodale a été calculée sur la base du nombre de feuilles présentes sur une longueur d'un mètre au milieu de la branche. L'indice de récolte a été calculé à partir du poids frais des feuilles et des rameaux. Le poids sec de 100 feuilles matures a été mesuré en les séchant au four à 80° C pendant 48 heures. Le rendement en feuilles a été enregistré quatre fois par an, de manière synchronisée avec les saisons d'élevage du ver à soie. Après chaque récolte de feuilles, les plantes ont été taillées au niveau du sol. La teneur en humidité de la feuille a été calculée d'après des rapports précédents (Vijayan et coll., 1997). Les quantités de sucres solubles totaux et les protéines ont été mesurées en suivant Morris (1948) et Lowry et coll. (1951).

L'essai biologique des feuilles a été réalisé en donnant la feuille en nourriture au ver à soie *Bombyx mori* L. Pour chaque variété, les vers à soie ont été levés dans des plateaux séparés en les disposant en trois répétitions arrangées au hasard. Pour chaque répétition, 50 vers sont utilisés. Le poids de vers bien matures a été mesuré juste avant le filage. Le poids d'un cocon et la richesse soyeuse (%) ont été calculés à partir de 10 cocons dans chaque répétition.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le nombre de branches principales varie de manière significative selon les espacements et les variétés. Le nombre moyen le plus élevé en branches primaires (59,33) est observé dans la parcelle avec la densité de plantation la plus faible, grâce à l'espacement plus large. Cela est dû en grande partie à la présence en quantité suffisante de lumière, de nutriments, de CO₂ et d'eau. Kasiviswanathan et Iyengar (1970) ont aussi trouvé un effet similaire sur des variétés de mûrier diploïdes. La hauteur de la plante est plus élevée avec un espacement plus resserré (140,38). Avec 60 × 60 cm, la hauteur de la plante est moins élevée qu'avec les espacements plus large et plus resserré. La hauteur de la plante plus élevée observée pour l'espacement le plus étroit est peut être due à l'étiollement partiel de la tige venant du manque de lumière. La distance nodale, un caractère indésirable, est de même plus élevée avec un espacement resserré, comme l'indique le nombre inférieur de feuilles par rameau. L'indice de récolte basé sur le poids frais, n'est pas significativement différent entre les plants provenant de densités de population différentes. Le rendement en feuilles, le caractère le plus important, montre une variation très significative entre l'espacement de 60 × 60 cm et les deux autres espacements.

Cependant, nous avons également pu voir que le rendement moyen en feuilles avec l'espacement de 45 × 45 cm (29 628 kg/ha/an) est meilleur qu'avec l'espacement de 150 × 150 cm

(23 013 kg/ha/an). Le rendement moyen en feuilles chez la plupart des variétés est bien inférieur pour l'espacement le plus large. Cette chute du rendement en feuilles avec l'espacement le plus large est due à la baisse du nombre de plants présents par surface unitaire. Cependant, la variété S1708 donne un aussi bon rendement avec tous les espacements, ce qui montre l'effet compensatoire de facteurs contribuant au rendement comme le nombre de branches, la distance nodale plus courte et un poids de feuille plus élevé. Hasegawa (1967) a aussi observé ce type de relation avec les variétés ayant une capacité de ramification élevée.

L'analyse biochimique de la feuille démontre qu'il y a plus de protéines et de sucres chez les plantes cultivées selon un espacement de 150×150 cm, ce qui indique une qualité supérieure. Chaudhury et coll., (1991) ont aussi trouvé plus de protéines et de sucres dans les feuilles de plants cultivés avec un grand espacement. Les résultats de l'analyse biologique renforcent les observations ci-dessus, à savoir que les plantes cultivées avec un espacement plus large ont une meilleure valeur nutritive. Das et coll. (1993) ont rapporté une amélioration significative du ratio feuille-cocon et de la teneur absolue en soie quand les vers à soie sont nourris avec des feuilles de mûrier cultivées avec un espacement plus grand. Cependant, Sengupta et coll. (1973) n'ont pas trouvé de différence quant à la qualité du cocon. Krishnaswamy et coll. (1970), d'autre part, ont observé une augmentation significative du poids larvaire et du poids du cocon.

Comme le profit économique en sériciculture dépend en grande partie de la qualité et de la quantité des feuilles de mûrier, il est absolument essentiel d'avoir un espacement optimum pour générer la rentabilité maximale en sériciculture. En général, la qualité de la feuille chez les triploïdes est bien meilleure que chez les diploïdes, les feuilles de triploïdes sont donc extrêmement bien adaptées à l'élevage des vers à soie. Un espacement qui donne un rendement en feuilles supérieur, avec un faible impact négatif sur la qualité des feuilles est donc considéré comme une densité de plantation optimum. Dans cette étude, nous avons observé que la densité de plantation de 60×60 cm donne les meilleurs résultats, elle peut donc être adoptée pour la culture de mûriers triploïdes dans des conditions climatiques tropicales.

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

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

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

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

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

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

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

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 ed., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's name, 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.

