

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION
EDITORIAL BOARD

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (France)
BOSQUET G. (France)
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)
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*)
FOURCHE 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)
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*)
J. E. MIRANDA (Brésil / *Brazil*)
TAKEDA S. (Japon / *Japan*)
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*)

VARIATION IN GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVITY IN DROUGHT TOLERANT AND SENSITIVE GENOTYPE OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.)

C. DAS, A. K. MISRA, T. SENGUPTA & B. SARATCHANDRA

Mulberry Physiology Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

Glutathione reductase (EC NO. 1.6.4.2) activity was measured from the 5th leaves of two drought sensitive (S₁ and S₁₆₃₅) and two drought tolerant (S₁₃ and C₁₇₃₀) mulberry genotypes prior to and after water stress condition. Among the four tested genotypes, maximum glutathione reductase (GR) activity was obtained in S₁₃ (4.0 U mg⁻¹ protein min⁻¹) and C₁₇₃₀ (3.7 U mg⁻¹ protein min⁻¹) prior to water stress condition (non stress). Significant differences were found between non stressed and stressed plants of different genotypes. The GR activity was found maximum in S₁₃ (12.3 and 14.0 U mg⁻¹ protein min⁻¹) under moderate and severe water stress condition respectively followed by C₁₇₃₀. Minimum GR activity were obtained in two sensitive genotypes - S₁ (8.6 U mg⁻¹ protein min⁻¹) and S₁₆₃₅ (8.4 U mg⁻¹ protein min⁻¹) under severe water stress condition indicating that estimation of GR activity may be used as a screening tool for selection of drought tolerant mulberry genotypes.

Keywords : Mulberry genotypes, water stress, glutathione reductase.

INTRODUCTION

The simple tripeptide reduced Glutathione (GSH) is found in all living cells and takes part in numerous biochemical reactions as well as stabilising certain proteins by preventing oxidation of thiol group (Jocelyn, 1972; Halliwell, 1984). Glutathione reductase (GR) levels are higher in plants exposed to drought although the manner by which this is achieved depends on the kind of plant and experimental condition. Smirnoff and Colombe (1988) reported that the specific activity of GR increased more than 2 fold in the leaf of *Eragrostis*, where the leaf water deficit was more negative than -3.0 MPa which was induced by withholding water application. Numerous studies have shown in other crops an increase in total GR & GSH in plants exposed to stress (Carnegie, 1963; Guri Asaf, 1983). However, little information is available in this regard in mulberry. So this study was undertaken to find out variation of GR activity in the drought tolerant and sensitive genotypes of mulberry.

MATERIALS AND METHODS

The mulberry (*Morus alba* L.) cv. S₁ and S₁₆₃₅ (drought sensitive), S₁₃ and C₁₇₃₀ (drought tolerant) saplings were planted in earthen pots containing 19 kg of soil and farm yard manure (3:1). The plants were maintained in green house under natural photoperiod by daily irrigation upto the field capacity. The three months old plants were divided into three sets - one set of plants received water to the field capacity served as control i.e. zero (0) stress. The other two sets received water daily for

10 days to maintain soil moisture for 50% and 25% of the field capacity which served as moderate and severe water stress respectively.

After the treatment 100 mg fresh leaves of 5th position (maximum photosynthetic efficiency) from the top were chopped and homogenized with 10 ml 100 mM Potassium Phosphate buffer (pH 7.5) with 2.0 g polyvinyl following the procedure of Smith *et al.*, (1988) with slight modification. The homogenate was centrifuged at 20,000 g for 10 min and the supernatant was recentrifuged at 37,000 g for 15 min. at 4° C. The final supernatant was collected and used as a crude leaf enzyme source. All operations were carried out at 0 - 4 °C. To determine the activity of glutathione reductase (GR) the assay mixture was constituted of 0.6 ml of 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 ml DTNB (7.6mM), 0.1 ml NADPH (3.6mM), 0.1 ml GSSG (15 mM) and 0.1 ml crude enzyme source (CES). In the blank instead of CES equal volume of phosphate buffer was added. The mixture was kept at 25° C for 30 minutes. Optical density was recorded at 412 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The glutathione reductase activity (GR) showed considerable variability between the sensitive and tolerant genotypes of mulberry (3.2 to 4.0 U mg⁻¹ protein min⁻¹) prior to water stress condition (control).

Table 1. Variation in Glutathione reductase activity (U mg⁻¹ protein min⁻¹) in leaves of sensitive and tolerant genotypes before and after water stress condition.

Tableau I. Variation de l'activité de glutathion-réductase (U mg⁻¹ protéine min⁻¹) dans les feuilles des génotypes sensibles et tolérants avant et après la condition de stress hydrique.

Genotype	Water stress		
	Zero	Moderate	Severe
		% increase over non stress	% increase over non stress
<i>Génotype</i>		<i>Stress hydrique</i>	
	Zéro	Modéré	Sévère
		% d'augmentation par rapport à l'absence de stress	% d'augmentation par rapport à l'absence de stress
S1	3.2	7.6	131.72
S1635	3.2	7.1	120.77
S13	4.0	12.3	199.72
C1730	3.7	10.0	168.88
			8.6
			8.4
			14.0
			11.3
			163.79
			150.96
			241.71
			201.51

	CD at 5%	SE
Gen	0.111	0.039
Stress	0.111	0.039
G × st	0.221	0.078

Each value is the average of five measurements (two plants per measurement)./ *Chaque valeur est la moyenne de cinq mesures (deux plants par mesure).* Zero = Full irrigation / *Zéro = Irrigation complète.* Moderate = 50% irrigation / *Modérée = 50 % d'irrigation.* Severe = 25% irrigation / *Sévère = 25 % d'irrigation.*

The data indicated that the GR activity in endogenous level was observed significantly more in S₁₃ (4.0 U mg⁻¹ protein min⁻¹) followed by C₁₇₃₀ (3.7 U mg⁻¹ protein min⁻¹) which exhibited drought tolerant character than that of S₁ and S₁₆₃₅.

Moreover, differences in the glutathione reductase activity (GR) between tolerant and sensitive genotypes could be due to the presence of two or more isoenzymes in drought insensitive plants as suggested by Guri Asaf (1983). The higher rate of glutathione reductase activities (GR) were obtained in two tolerant genotypes of S₁₃ (14.0 U mg⁻¹ protein min⁻¹) and C₁₇₃₀ (11.3 U mg⁻¹ protein min⁻¹) under severe water stress condition (Table I) where the field capacity was maintained upto 25%. In S₁ and S₁₆₃₅ (sensitive genotypes) the glutathione reductase activities were found significantly lower compared to S₁₃ and C₁₇₃₀ (Table II). In this study with the increase of water stress the GR activity became significantly higher than control. The activity of GR in the tolerant genotypes – S₁₃ and C₁₇₃₀ were almost twice as high as specific activity of GR in sensitive genotype (S₁ and S₁₆₃₅) which implies that the rate of conversion from the oxidized form GSSG to its reduced form GSH is higher in tolerant genotype – S₁₃ and C₁₇₃₀. Subsequently they have more GSH molecules with water stress condition. So GSH plays a major role in water stress injury repairing mechanism and its conversion rate from GSSG (catalysed by GR) is perhaps one way by which tolerant cultivars can tolerate certain levels of water stress condition. Singh and Verma (2001) reported that glutathione, an indicator of stress resistance show almost two fold difference between control and transgenic lines where higher decline of glutathione content in control (PBI 121) compared to GH – 5 and GH – 9 (transgenic line) due to oxidative stress was observed.

The present study indicated that for identification of water stress tolerant and sensitive genotypes, the measurement of glutathione reductase enzyme activity may be taken as a screening tool.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Mr. Mangal Saha, Field Assistant, Mulberry Physiology Laboratory for his help during the period study.

REFERENCES

- CARNEGIE P. R. (1963) Isolation of a homologue of glutathione and other acidic peptides from seedlings of *Phaseolus aureus*. Biochem. J. 89 :459-471.
- GURI ASAF (1983) Variation in Glutathione and Ascorbic acid content among selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* prior to and after exposure to ozone. Can. J. Plant Sci. 63 : 733-737.
- HALLIWELL B. (1984) Chloroplast Metabolism : The structure and function of Chloroplasts in Green leaf cell. Oxford : Clarendon press pp 180-187.
- JOCELYN P. C. (1972) Biochemistry of the SH group London : Academic Press PP 323-334.
- SINGH B., VERMA DESHPAL, S. (2001). Glutathione – an antioxidant to withstand oxidative stress in transgenic lines of tobacco. Indian J. Plant Physiol. 6 : 229-232.
- SMIRNOFF N., COLOMBE S. V. (1988) Drought influences the activity of enzymes of chloroplast hydrogen peroxide Scavenging system. J. Exp. Bot 39 :1097-1108
- SMITH I. K., VIERHELLER T.L. THORNE C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5 dithiobis (2-nitro benzoic acid) Analytical Biochem 175 : 408-413.

VARIATION DE L'ACTIVITE DE LA GLUTATHION-REDUCTASE CHEZ LES GENOTYPES DE MURIER (*MORUS ALBA* L.) TOLERANTS ET SENSIBLES A LA SECHERESSE

C. DAS, A. K. MISRA, T. SENGUPTA & B. SARATCHANDRA

Mulberry Physiology Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute,
Berhampore – 742 101, West Bengal, Inde.

On mesure l'activité de la glutathion-réductase (No. CE 1.6.4.2) sur la 5^{ème} feuille de deux génotypes de mûrier sensibles (S₁ et S₁₆₃₅) et tolérants la sécheresse (S₁₃ et C₁₇₃₀) avant et après une condition de stress hydrique. Parmi les quatre génotypes testés, on obtient l'activité maximum de glutathion-réductase (GR) chez S₁₃ (4 U mg⁻¹ protéines min⁻¹) et C₁₇₃₀ (3.7 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) avant la condition de stress hydrique (absence de stress). On trouve des différences significatives entre les plants non stressés et stressés des différents génotypes. On trouve l'activité GR maximum chez S₁₃ (12,3 et 14,0 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) avec respectivement une condition de stress hydrique modérée et sévère suivi par C₁₇₃₀. On constate une activité GR minimum chez les deux génotypes sensibles : S₁ (8,6 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) et S₁₆₃₅ (8,4 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) avec une condition de stress hydrique sévère, ce qui indique que l'estimation de l'activité de la GR peut être utilisée comme un outil de tri des génotypes de mûrier tolérant la sécheresse.

INTRODUCTION

On trouve le glutathion (GSH), tripeptide simple réduit, dans toutes les cellules vivantes et il prend part à de nombreuses réactions biochimiques ainsi qu'à la stabilisation de certaines protéines en empêchant l'oxydation du groupe thiol (Jocelyn, 1972 ; Halliwell, 1984). Les niveaux de glutathion-réductase (GR) sont plus élevés chez les plants exposés à la sécheresse bien que la façon dont ils soient obtenus dépend du type de plante et de la condition expérimentale. Smirnoff et Colombe (1988) ont rapporté que l'activité spécifique de la GR est multipliée par plus de 2 dans la feuille d'*Eragrostis*, où le déficit en eau de la feuille, induit par le défaut de fourniture d'eau, est inférieur à 3-Mpa. De nombreuses études chez d'autres cultures ont montré une augmentation de la GR et de la GSH totales chez les plants exposés au stress (Carnegie, 1963 ; Guri Asaf, 1983). Cependant, on dispose de peu d'information dans ce domaine chez le mûrier. Nous avons donc entrepris cette étude pour trouver la variation de l'activité de la GR chez les génotypes de mûrier tolérants et sensibles à la sécheresse.

MATERIELS ET METHODES

Les jeunes plants des cv. de mûrier (*Morus alba* L.) S₁ et S₁₆₃₅ (sensibles à la sécheresse), S₁₃ et C₁₇₃₀ (tolérant la sécheresse) sont plantés dans des pots en terre contenant 19 kg de sol et de fumure (3 : 1). Les plants sont maintenus en serre avec une photopériode naturelle sous une irrigation quotidienne jusqu'à la capacité du champ. Les plants de trois mois sont divisés en trois lots - un lot de plants recevant de l'eau jusqu'à la capacité du champ servant de témoin, c'est à dire sans stress (0).

Les deux autres lots reçoivent de l'eau quotidiennement pendant 10 jours pour maintenir l'humidité du sol à 50 % et 25 % de la capacité du champ et servent respectivement de stress hydrique modéré et sévère.

Après le traitement 100 mg de feuilles fraîches en position 5 (efficacité photosynthétique maximum) à partir du haut sont hachées et homogénéisées avec 10 ml de tampon phosphate de potassium (pH 7,5) à 100 mM avec 2 g de polyvinyle suivant la procédure de Smith et coll., (1988) légèrement modifiée. L'homogénat est centrifugé à 20 000 g pendant 10 min et le surnageant est recentrifugé à 37 000 g pendant 15 min. à 4° C. Le surnageant final est recueilli et utilisé comme source d'enzyme brute de la feuille. Toutes les opérations sont réalisées entre 0 et 4° C. Pour déterminer l'activité de la glutathion-réductase (GR), le mélange évalué est constitué de 0,6 ml du tampon de phosphate à 100 mM (pH 7,5), 0,1 ml de DTNB (7,6mM), 0,1 ml de NADPH (3,6mM), 0,1 ml de GSSG (15 mM) et 0,1 ml de la source d'enzyme brute (CES). Chez le témoin, au lieu de CES, on ajoute un volume égal de tampon phosphate. Le mélange est conservé à 25° C pendant 30 minutes. On enregistre la densité optique à 412 nm.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'activité de la glutathion-réductase (GR) présente une variabilité considérable entre les génotypes de murier sensibles et tolérants (3,2 à 4 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) avant la condition de stress hydrique (témoin).

Les données indiquent qu'on observe une activité GR au niveau endogène beaucoup plus importante chez S13 (4,0 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) suivi par C1730 (3,7 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) qui présentent une tolérance à la sécheresse supérieure à celle de S1 et S1635.

De plus les différences d'activité de la glutathion-réductase (GR) entre les génotypes tolérants et sensibles pourraient être dues à la présence d'au moins deux isoenzymes chez les plants insensibles à la sécheresse comme l'a suggéré Guri Asaf (1983). On obtient le taux le plus élevé d'activité de la glutathion-réductase (GR) chez les deux génotypes tolérants S13 (14,0 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) et C1730 (11,3 U mg⁻¹ protéine min⁻¹) avec une condition de stress hydrique sévère (Tableau I) où la capacité du champ est maintenue à 25 %. Chez S1 et S1635 (génotypes sensibles), les activités de la glutathion-réductase s'avèrent significativement plus faibles par comparaison à S13 et C1730 (Tableau II). Dans cette étude, avec l'augmentation du stress hydrique, l'activité GR devient significativement plus élevée que chez le témoin. L'activité GR des génotypes tolérants – S13 et C1730 est presque deux fois plus élevée que l'activité spécifique GR des génotypes sensibles (S1 et S1635), ce qui sous-entend que le taux de conversion du GSSG de la forme oxydée à la forme réduite du GSH est plus élevé chez le génotype tolérant – S13 et chez C1730. Par la suite, ils y a plus de molécules GSH avec une condition de stress hydrique. Donc, le GSH joue un rôle principal dans le mécanisme de la réparation du dommage dû au stress hydrique et son taux de conversion à partir du GSSG (catalysé par la GR) est peut-être une manière par laquelle les cultivars tolérants peuvent tolérer certains niveaux de condition de stress hydrique. Singh et Verma (2001) ont rapporté que le glutathion, un indicateur de résistance au stress présente une différence de presque deux entre le témoin et les lignées transgéniques avec un déclin plus élevé de la teneur en glutathion chez le témoin (PBI 121) due à l'oxydation du stress par comparaison à GH5 et GH-9 (lignées transgéniques).

Cette étude indique que l'on pourrait utiliser la mesure de l'activité de la glutathion-réductase comme outil de tri pour l'identification des génotypes tolérants et sensibles au stress hydrique.

COMPARATIVE PERFORMANCE OF THERMO-TOLERANT BIVOLTINE HYBRIDS OF SILKWORM *BOMBYX MORI* L. UNDER DIFFERENT TEMPERATURE AND HUMIDITY CONDITIONS

A. NASEEMA BEGUM, M. M. AHSAN, H. K. BASAVARAJA & M. REKHA

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

Ten hybrids of the silkworm *Bombyx mori* L. exposed to three different combinations of temperature and relative humidity i. e. $25 \pm 1^\circ \text{C}$ and $\text{RH } 75 \pm 5\%$; $31 \pm 1^\circ \text{C}$ and $\text{RH } 85 \pm 5\%$ and $36 \pm 1^\circ \text{C}$ and $\text{RH } 85 \pm 5\%$ were analysed for eight economic traits i.e., 5th instar period, yield / 10 000 larvae by number (cocoon survival), cocoon weight, shell weight, shell ratio, average filament length, raw silk percentage and reelability percentage. The performance of the hybrids at $25 \pm 1^\circ \text{C}$ and at $31 \pm 1^\circ \text{C}$ was comparable. The effect of temperature was significant for all the traits except for the shell ratio % ($P < 0.05$). The interaction effect (temperature $\times$ hybrid) was significant for survival ($P < 0.05$). At $36 \pm 1^\circ \text{C}$ temperature treatment, all the hybrids showed slightly better cocoon survival as compared to the control hybrid, KA $\times$ NB4D2. The better performance of these ten hybrids at $36 \pm 1^\circ \text{C}$ may be due to the maternal effect of thermo-tolerance where the female parent used was more tolerant. But the deleterious effect of high temperature and high humidity was more pronounced in KA $\times$ NB4D2, as evident from the low survival of cocoons (2944 at $36 \pm 1^\circ \text{C}$). However, two hybrids i.e., AHT $\times$ FHT (8996) and BHT $\times$ GHT (9155) recorded higher cocoon survival number when compared to the other hybrids at $36 \pm 1^\circ \text{C}$ and $\text{RH } 85 \pm 5\%$.

Keywords: Analysis of variance, *Bombyx mori* L., hybrids, thermo-tolerant, temperature treatment.

INTRODUCTION

Over the years, sericultural research in India has resulted in increased silk production and placed India next to China in the global silk scenario, but the silk quality remained poor due to the inherent defects of multi $\times$ bivoltine cocoons (Datta, 1984). To overcome this qualitative problem and to produce silk of international quality, there is an absolute necessity to rear bivoltine silkworm. India, being a tropical country, is not conducive for rearing bivoltine silkworms which are temperate in origin all through the year.

In recent years, highly productive, superior quality Bi $\times$ Bi hybrids have been evolved for commercial exploitation of silk (Basavaraja, 1995). But these hybrids have been identified for rearing only during favourable seasons of the year (August-February). Hence silkworm breeds tolerant to fluctuating tropical climate and resistant to diseases are required for rearing throughout the year in India (Naseema *et al.*, 2000). In sericulturally advanced countries like China, distinct bivoltine silkworm breeds suitable for rearing during summer and autumn are evolved (Shao *et al.*, 1987, 1990, He *et al.*, 1991, Zhang *et al.*, 1994). Japanese scientists have studied the influence of high temperature on silkworm growth and development (Takeuchi *et al.*, 1964, Ohi and Yamashita, 1977, Huang *et*

al., 1979, He and Oshiki, 1984). Kato *et al.*, (1989) also studied the adverse effect of temperature on silkworm and reported that the temperature tolerance is a heritable character and it may be possible to evolve thermo-tolerant silkworm breeds. Further, Tazima and Ohnuma (1995) confirmed the genetical heritability of thermo-tolerance, based on the survival of the silkworm exposed to high temperature during fifth instar. Suresh Kumar and Yamamoto (1995) have also explained the maternal inheritance of thermo-tolerance based on exposure of pure races and their hybrids to high temperature.

In the present study an attempt has been made to evaluate the performance of the newly evolved hybrids at three different temperature and humidity treatments for the selection of the tolerant hybrids for rearing throughout the year.

MATERIALS AND METHODS

Four thermo-tolerant bivoltine breeds i.e. A HT, B HT (Oval) were crossed with eleven dumb-bell productive breeds and F HT, G HT (Dumb-bell) were crossed with nine oval productive breeds and thermo-tolerant oval breeds were crossed with thermo-tolerant dumbbell breeds and a total of forty four hybrids were prepared, evaluated and short-listed based on evaluation index larger than 50. Ten silkworm hybrids i.e., A × CSR5, A × F, A × B61, AHT × 935E, B × G, A × G, B × F, G × CSR12, G × A1 and AHT × CSR 13, (short-listed out of forty four hybrids based on evaluation index value larger than 50) along with the control hybrid KA × NB4D2 formed the experimental material for this study. The parents of the short-listed hybrids and their characteristics are as follows: A HT, A1, B HT, KA, CSR12, CSR13 (Oval) and CSR5, NB4D2, F HT, G HT, B61, 935 E (Dumbbell).

Characteristics of the parents in the selected hybrids:

Sl. No.	Breed	Larval Marking	Cocoon shape	Pupation rate	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio %
1	A HT	Plain	Oval	94.6	1.629	0.310	19.0
2	A1	Plain	Oval	92.6	1.704	0.339	19.4
3	B HT	Plain	Oval	91.3	1.705	0.352	20.6
4	KA	Plain	Oval	90.5	1.621	0.322	19.8
5	CSR12	Sex-limited (M + P)	Oval	86.0	1.868	0.468	24.5
6	CSR13	Plain	Oval	83.3	1.641	0.362	22.05
7	F HT	Plain	Dumb-bell	91.3	1.602	0.313	19.5
8	NB4D2	Plain	Dumb-bell	92.3	1.653	0.320	19.4
9	CSR5	Plain	Dumb-bell	83.5	1.840	0.430	23.8
10	GHT	Marked	Dumb-bell	93.3	1.605	0.309	19.3
11	B61	Marked	Dumb-bell	75.3	1.579	0.309	19.6
12	935 E	Marked	Dumb-bell	90.7	1.628	0.319	19.6

The hybrids were subjected to three different temperature treatments i.e., $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and RH $75 \pm 5\%$, $31 \pm 1^\circ\text{C}$ and RH $85 \pm 5\%$ and $36 \pm 1^\circ\text{C}$ and RH $85 \pm 5\%$. Silkworm hybrids were exposed to a constant temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $31 \pm 1^\circ\text{C}$ from the time of brushing till spinning in the first two temperature treatments. But in the third temperature treatment, the silkworm hybrids were reared from the time of brushing up to the fifth instar second day at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and RH $75 \pm 5\%$ and thereafter they were given temperature shock of $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for six hours daily from 10 a. m. to 4.00 p. m. till spinning. After spinning, the cocoons were brought back to $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and RH $85 \pm 5\%$. Rearing was carried out by following standard rearing technique (Krishnaswami, 1978). After pupation, cocoons, were removed on the 6th day from the mountage frames. Cocoons were cut open and total number of live pupae were recorded. Observations were recorded on larval period, number of pupae survived,

cocoon weight, shell weight, shell ratio %, average filament length, raw silk % and reelability %. Weight of ten live cocoons and ten shells were recorded for the calculation of cocoon weight, shell weight and shell ratio in each hybrid. From the hybrid cocoons reared at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $31 \pm 1^\circ\text{C}$, sixty cocoons were selected per replication and a total of 180 cocoons were reeled at the multi-end reeling machine of Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore to study the reeling characters, i. e., average filament length, raw silk % and reelability %.

One hundred cocoons were randomly selected from ten hybrids for the measurement of cocoon length, cocoon width and for the determination of length / width ratio in each hybrid. Length and width of the cocoons were measured using vernier calipers. Cocoon shape variation was determined by uniformity test based on standard deviation (Mano, 1994). Cocoon length / width ratio, its standard deviation and coefficient of variation of each cocoon were considered for cocoon uniformity test (Nakada, 1989, 1991, 1992a, 1992b, 1993, 1994). Hybrids showing standard deviation inferior to eight were considered uniform in cocoon shape in silkworm hybrids (Ravindra Singh *et al.*, 1998, 2001a and 2001b).

The rearing and reeling data of the hybrids reared at the three different temperature and humidity treatments were analysed statistically by analysis of variance method (Sokal and Rohlf, 1969).

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the hybrids subjected to three different temperature treatments are presented in Table I, Table II, Table III. The performance of the selected hybrids at three different temperature treatments are presented in Figures 1 to 5.

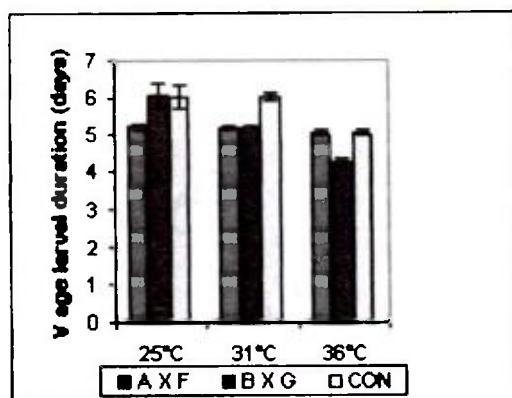


Fig. 1. Effect of three temperature treatments on the Vth instar larval duration. Values are shown in days.

Fig. 1. Effet de trois traitements de température sur la durée larvaire du 5^{ème} âge. Les valeurs apparaissent en jours.

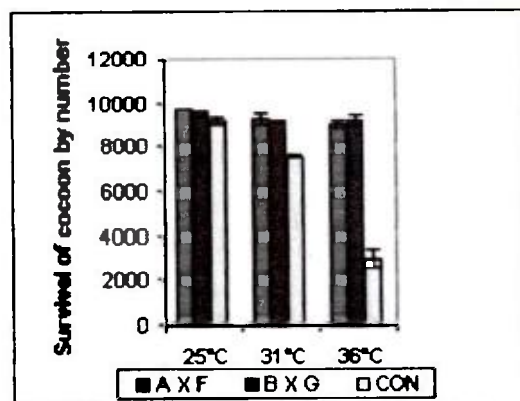


Fig. 2. Effect of three temperature treatments on the total cocoon yield in the hybrids. Yield / 10 000 larvae are expressed in number.

Fig. 2. Effet de trois traitements de température sur le rendement total en cocons chez les hybrides. Le rendement pour 10 000 larves est exprimé en nombre.

Table I. Mean performance of the ten selected hybrids at $25 \pm 1^\circ \text{C}$ temperature treatment.

Tableau I. Performance moyenne des dix hybrides sélectionnés avec un traitement de température à $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Hybrid		V age duration (d)	Cocoon yield by number	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio	Average filament length	Raw silk	Reelability
Hybride		Durée du 5 ^{ème} âge (j)	Rendement en cocons en nombre	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur moyenne du filament (m)	Soie grège (%)	Dévidabilité (%)
AHT × CSR5	Mean / Moyenne	5.22	9465	1.827	0.371	20.32	989.67	14.14	83.07
	Max	6.00	9489	1.862	0.374	20.89	1046.00	15.63	86.13
	Min	5.18	9450	1.791	0.367	19.69	954.00	13.40	80.40
	SE	0.08	12.12	0.02	0.00	0.35	28.50	0.74	1.67
AHT × FHT	Mean / Moyenne	5.20	9701	1.855	0.385	20.77	982.67	12.73	85.06
	Max	6.00	9759	1.874	0.387	20.97	987.00	13.90	86.27
	Min	5.18	9644	1.845	0.384	20.53	978.00	11.90	84.13
	SE	0.07	33.20	0.01	0.00	0.13	2.60	0.60	0.63
AHT × B61	Mean / Moyenne	6.00	9576	1.971	0.405	20.55	991.00	13.77	86.20
	Max	6.04	9650	1.978	0.406	20.70	993.00	15.70	87.24
	Min	5.20	9533	1.959	0.404	20.43	987.00	12.80	85.50
	SE	0.09	37.16	0.01	0.00	0.08	2.00	0.97	0.53
AHT × 935E	Mean / Moyenne	6.08	9534	1.763	0.351	19.93	987.00	13.14	86.77
	Max	7.02	9700	1.875	0.382	20.56	1080.00	15.46	87.10
	Min	5.22	9228	1.646	0.333	18.83	852.00	11.00	86.37
	SE	0.38	153.18	0.07	0.02	0.55	69.09	1.29	0.21
BHT × GHT	Mean / Moyenne	6.05	9501	1.822	0.369	20.25	932.67	11.49	84.58
	Max	6.21	9722	1.943	0.395	21.58	1021.00	12.40	86.37
	Min	5.18	9281	1.698	0.329	19.37	854.00	10.10	82.55
	SE	0.34	127.31	0.07	0.02	0.68	48.45	0.71	1.11
AHT × GHT	Mean / Moyenne	6.02	9582	1.766	0.370	20.94	885.67	12.63	82.14
	Max	6.06	9722	1.932	0.401	21.52	931.00	13.33	87.03
	Min	6.00	9374	1.658	0.341	20.53	798.00	11.95	79.10
	SE	0.08	106.06	0.08	0.02	0.30	43.84	0.40	2.47
BHT × FHT	Mean / Moyenne	5.23	9361	1.879	0.376	20.08	909.67	12.63	84.28
	Max	6.03	9550	1.981	0.380	21.34	953.00	13.50	91.03
	Min	5.18	9133	1.753	0.374	19.19	826.00	12.20	80.10
	SE	0.11	121.95	0.07	0.00	0.65	41.84	0.43	3.41
GHT × CSR12	Mean / Moyenne	6.02	9512	1.824	0.384	21.17	1016.00	12.94	83.33
	Max	6.06	9767	2.031	0.394	22.10	1027.00	16.30	87.10
	Min	6.00	9269	1.675	0.370	19.41	998.00	11.15	80.75
	SE	0.08	143.89	0.11	0.01	0.88	9.07	1.68	1.93

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

GHT × CSR13	Mean / Moyenne	5.23	9554	1.782	0.386	21.70	973.67	13.46	87.07
	Max	6.03	9668	1.844	0.400	22.44	1028.00	17.97	91.20
	Min	5.18	9444	1.717	0.377	20.72	936.00	10.20	83.70
	SE	0.11	64.69	0.04	0.01	0.51	27.83	2.33	2.20
GHT × A1	Mean / Moyenne	5.23	9523	1.966	0.397	20.22	926.67	11.54	85.21
	Max	6.03	9750	2.061	0.403	21.14	986.00	12.53	87.50
	Min	5.18	9230	1.856	0.392	19.53	873.00	10.73	81.75
	SE	0.11	153.70	0.06	0.00	0.48	32.74	0.53	1.76
Control: Témoin (KA × NB ₄ D ₂)	Mean / Moyenne	6.03	9213	1.729	0.332	19.20	897.00	12.60	80.60
	Max	6.18	9571	1.821	0.340	19.61	916.00	15.41	82.77
	Min	5.18	8967	1.669	0.327	18.70	877.00	10.50	77.47
	SE	0.32	183.23	0.05	0.00	0.27	11.27	1.46	1.60

In China, silkworm breeds suitable for rearing during summer and autumn have been evolved and commercially exploited (Shao *et al.*, 1987, 1990, Shao ruli, 1989, He *et al.*, 1990, He *et al.*, 1991, Zhang *et al.*, 1994). A robust bivoltine silkworm hybrid CSR18 × CSR19 has been evolved for rearing during summer season in India (Datta *et al.*, 2000). Two high temperature tolerant silkworm breeds i.e. NP2 and SP2 have been evolved for rearing in the tropical climatic areas of Karnataka, India (Krishna Rao *et al.*, 1996). Ramesh *et al.*, (1996) bred silkworm hybrids with high survival and with medium productivity traits for rearing in the tropics. Based on the comparative studies on the performance of robust and productive silkworm hybrids under high temperature ($36 \pm 1^\circ\text{C}$ and $80 \pm 5\%$), Suresh Kumar *et al.*, (1999) have reported that the productive hybrids are more susceptible to high temperature and humidity than the robust hybrids.

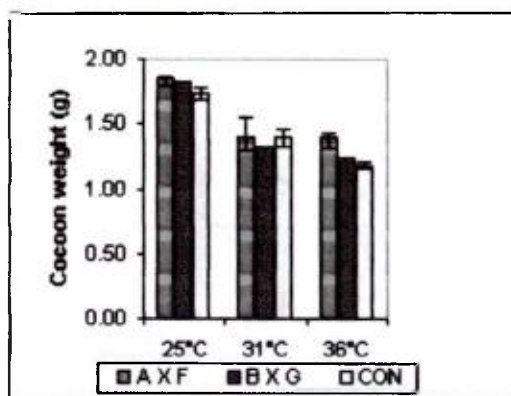


Fig 3. Effect of three temperature treatments on the cocoon weight in the hybrids. Values are expressed in grams.

Fig. 3. Effet de trois traitements de température sur le poids du cocon chez les hybrides. Les valeurs sont exprimées en grammes.

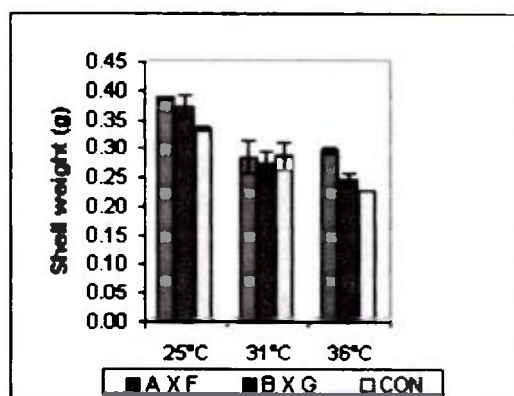


Fig. 4. Effect of three temperature treatments on the shell weight in the hybrids. Values are expressed in grams.

Fig. 4. Effet de trois traitements de température sur le poids de la coque chez les hybrides. Les valeurs sont exprimées en grammes.

Table II. Mean performance of the ten selected hybrids at 31 ± 1° C temperature treatment.*Tableau II. Performance moyenne des dix hybrides sélectionnés avec un traitement de température à 31 ± 1° C.*

Hybrid		V age duration (d)	Cocoon yield by number	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio	Average filament length	Raw silk	Reelability
Hybride		Durée du 5 ^{ème} âge (j)	Rendement en cocons en nombre	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur moyenne du filament (m)	Soie grège (%)	Dévidabilité (%)
AHT × CSR5	Mean / Moyenne	5.20	8989	1.405	0.279	19.73	931.00	13.43	82.14
	Max	6.00	9233	1.573	0.323	20.55	969.00	13.48	85.62
	Min	5.18	8833	1.282	0.254	18.66	855.00	13.40	80.40
	SE	0.07	123.69	0.09	0.02	0.56	38.00	0.03	1.74
AHT × FHT	Mean / Moyenne	5.18	9256	1.405	0.282	20.08	959.00	11.31	83.86
	Max	5.20	9733	1.671	0.337	20.71	1028.00	11.90	86.33
	Min	5.15	8967	1.186	0.245	19.37	877.00	10.20	81.55
	SE	0.06	240.41	0.14	0.03	0.39	44.07	0.56	1.38
AHT × B61	Mean / Moyenne	5.19	8428	1.414	0.285	20.18	943.00	12.13	86.46
	Max	5.20	9567	1.655	0.329	22.08	1002.00	12.80	85.50
	Min	5.18	6950	1.225	0.255	18.59	825.00	10.79	85.37
	SE	0.03	774.24	0.13	0.02	1.02	59.00	0.67	0.04
AHT × 935E	Mean / Moyenne	5.23	8644	1.455	0.302	20.74	958.00	12.16	78.63
	Max	6.08	9700	1.619	0.336	21.99	1080.00	13.60	87.10
	Min	5.18	7800	1.328	0.259	19.50	734.00	11.00	72.35
	SE	0.18	558.57	0.09	0.02	0.72	112.15	0.76	4.40
BHT × GHT	Mean / Moyenne	5.19	9122	1.320	0.269	20.36	912.67	11.31	79.86
	Max	5.20	9200	1.511	0.313	21.28	1009.00	12.43	83.30
	Min	5.18	8967	1.142	0.243	19.10	812.00	10.10	73.20
	SE	0.03	77.67	0.11	0.02	0.35	56.91	0.67	3.33
AHT × GHT	Mean / Moyenne	5.20	9178	1.363	0.285	20.92	874.67	11.42	78.82
	Max	6.00	9367	1.668	0.341	21.36	986.00	11.95	81.75
	Min	5.18	8933	1.182	0.253	20.45	798.00	10.73	74.40
	SE	0.08	128.30	0.15	0.03	0.26	56.97	0.36	2.25
BHT × FHT	Mean / Moyenne	5.20	9300	1.369	0.270	19.72	858.67	12.28	83.58
	Max	6.00	9533	1.625	0.321	20.90	961.00	13.50	89.90
	Min	5.18	9133	1.200	0.237	18.49	789.00	11.15	80.10
	SE	0.08	120.19	0.13	0.03	0.70	52.27	0.68	3.16
GHT × CSR12	Mean / Moyenne	5.20	9122	1.459	0.294	20.19	1013.00	12.34	81.92
	Max	6.00	9400	1.670	0.333	20.42	1067.00	14.27	84.80
	Min	5.18	8867	1.325	0.271	19.93	961.00	11.15	80.20
	SE	0.07	154.27	0.11	0.02	0.14	30.61	0.97	1.45

Table II. Continued. / *Tableau II. Suite.*

GHT × CSR13	Mean / <i>Moyenne</i>	5.20	9156	1.402	0.291	20.81	957.67	12.13	81.78
	Max	6.00	9700	1.596	0.327	22.41	1028.00	14.00	85.33
	Min	5.18	8800	1.248	0.266	19.55	892.00	10.20	76.30
	SE	0.14	276.40	0.10	0.02	0.84	39.33	1.10	2.78
GHT × A1	Mean / <i>Moyenne</i>	5.21	8789	1.436	0.287	20.02	953.67	11.41	84.43
	Max	6.04	9433	1.615	0.321	21.06	986.00	11.90	90.00
	Min	5.18	7733	1.266	0.267	19.14	903.00	10.73	81.55
	SE	0.09	532.10	0.10	0.02	0.56	25.65	0.35	2.78
Control / <i>Témoin</i> (KA × NB4D2)	Mean / <i>Moyenne</i>	6.00	7533	1.393	0.284	20.32	830.00	12.04	77.37
	Max	6.04	8467	1.517	0.313	21.69	972.00	13.80	81.55
	Min	5.20	6900	1.268	0.236	18.63	604.00	10.43	72.47
	SE	0.22	476.63	0.07	0.02	0.90	114.23	0.98	2.65

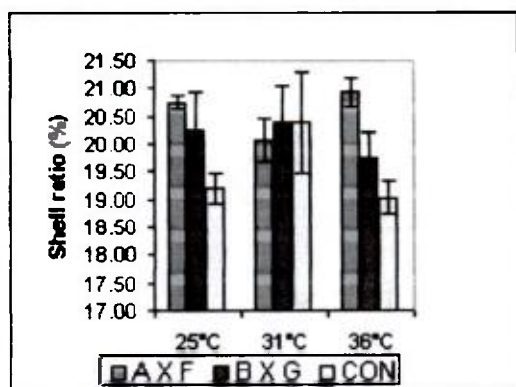


Fig. 5. Effect of three temperature treatments on the shell ratio in the hybrids. Values are expressed in percentage.

Fig. 5. Effet de trois traitements de température sur la richesse soyeuse chez les hybrides. Les valeurs sont exprimées en pourcentage.

In the present study, the mean performance of the hybrids reared at $25 \pm 1^\circ \text{C}$ and $31 \pm 1^\circ \text{C}$ were comparable while at $36 \pm 1^\circ \text{C}$ the hybrids showed a variation in cocoon survival number ranging from 4611 to 9155. The deleterious effect of high temperature and high humidity was more pronounced in the control hybrid KA × NB4D2 as evident from the survival number (2944). The interaction of the temperature with the hybrids showed a significant variation for yield of cocoons by number ($P < 0.05$). But the little higher pupation number observed in the hybrids at $36 \pm 1^\circ \text{C}$ may be due to the thermo-tolerant female parent and the results are in concurrence with the results of Suresh Kumar *et al.*, (1999) where they have shown the deleterious effect of high temperature and high humidity on productive breeds compared to the robust hybrids.

Table III. Mean performance of the ten selected hybrids at $36 \pm 1^\circ \text{C}$ temperature treatment.

Tableau III. Performance moyenne des dix hybrides sélectionnés avec un traitement de température à $36 \pm 1^\circ \text{C}$.

Hybrid		V age Duration number	Cocoon yield by weight	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio
Hybride		<i>Durée du 5^{ème} âge en nombre (h)</i>	<i>Rendement en cocons (g)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
AHT × CSR5	Mean / <i>Moyenne</i>	5.08	5567	1.302	0.268	20.83
	Max	5.18	5933	1.460	0.291	22.73
	Min	5.00	5367	1.170	0.248	19.51
	SE	0.22	183.41	0.08	0.01	0.97
AHT × FHT	Mean / <i>Moyenne</i>	5.02	8996	1.400	0.293	20.93
	Max	5.06	9233	1.435	0.304	21.30
	Min	5.00	8757	1.338	0.282	20.40
	SE	0.08	137.41	0.03	0.01	0.27
AHT × B61	Mean / <i>Moyenne</i>	5.06	7706	1.364	0.279	20.42
	Max	5.06	9200	1.424	0.298	20.93
	Min	5.06	6200	1.334	0.269	20.16
	SE	0.00	866.05	0.03	0.01	0.26
AHT × 935E	Mean / <i>Moyenne</i>	5.00	8518	1.241	0.246	19.77
	Max	5.06	9047	1.424	0.298	20.93
	Min	4.18	7719	1.118	0.219	18.54
	SE	0.14	406.55	0.09	0.03	0.69
BHT × GHT	Mean / <i>Moyenne</i>	4.22	9155	1.226	0.242	19.75
	Max	5.02	9633	1.398	0.267	20.65
	Min	4.18	8700	1.138	0.223	19.07
	SE	0.10	269.57	0.09	0.01	0.47
AHT × GHT	Mean / <i>Moyenne</i>	4.23	7411	1.316	0.268	20.48
	Max	5.04	8566	1.501	0.290	21.10
	Min	4.18	6400	1.208	0.255	19.37
	SE 0.12	629.40	0.09	0.01	0.55	
BHT × FHT	Mean / <i>Moyenne</i>	4.23	6189	1.312	0.252	19.19
	Max	5.00	7733	1.536	0.283	20.58
	Min	4.20	4533	1.196	0.225	18.15
	SE	0.05	925.44	0.11	0.02	0.72
GHT × CSR12	Mean / <i>Moyenne</i>	4.22	6178	1.355	0.271	19.89
	Max	5.02	8900	1.549	0.329	21.24
	Min	4.18	1933	1.223	0.238	18.33
	SE	0.10	2150.42	0.10	0.03	0.85

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

GHT × CSR13	Mean / Moyenne	4.18	4160	1.292	0.256	19.85
	Max	5.02	4250	1.593	0.309	21.13
	Min	4.06	4000	1.126	0.220	18.99
	SE	0.26	80.21	0.15	0.03	0.65
GHT × A1	Mean / Moyenne	5.04	7211	1.378	0.267	19.98
	Max	5.06	7700	1.448	0.279	19.63
	Min	5.00	6833	1.320	0.254	19.24
	SE	0.08	256.36	0.04	0.01	0.13
Control / Témoin (KA × NB4D2)	Mean / Moyenne	5.03	2944	1.177	0.222	19.06
	Max	5.06	3733	1.216	0.222	19.65
	Min	5.00	2367	1.130	0.222	18.73
	SE	0.07	408.24	0.03	0.00	0.30

This study is also in accordance with the observations of Shibukawa (1965) who established that the hybrids perform better with the lines selected at high temperature than the lines selected at normal temperature. In the present study the better performance of the hybrids at $36 \pm 1^\circ \text{C}$ may be due to the inheritance of thermo-tolerance from the female parent. This is in conformity with the results of Shirota (1992), Tazima and Ohuma (1995) wherein they have confirmed the genetically inheritance of thermo-tolerance on survival of silkworm reared at 36°C . From the above study, two thermo-tolerant hybrids i.e., AHT × FHT and BHT × GHT identified may be utilised as breeding resource material in the evolution of new bivoltine breeds / hybrids. The hybrids may also be recommended for rearing throughout the year after field evaluation.

REFERENCES

- BASAVARAJA H. K., NIRMAL KUMAR S., SURESH KUMAR, N., MAL REDDY N., KSHAMA GIRIDHAR, AHSAN M. M. & DATTA R. K. (1995) New productive bivoltine hybrids. *Indian Silk*, 34(2): 5-9.
- DATTA R. K. (1984) Improvement of silkworm race (*Bombyx mori*) in India. *Sericologia*, 24(3): 393-415.
- DATTA R. K., SURESH KUMAR, BASAVARAJA, H. K. & MAL REDDY N. (2000) CSR18 × CSR19. A robust bivoltine hybrid for rearing throughout the year in the tropics. Seminar in Sericulture Technology an appraisal. Abstracts, 6-7 June.
- HE SIMEI, YAN XIAOYIN MI YIDIAN & XIA LINGZHI (1989) Breeding of a new silkworm variety "Fengli" × "54A" for summer-autumn rearing. *Science of Sericulture* 15: (2), 79-87.
- HE SIMEI, XIA LING-ZHI, YAN XIAO-YIN, MIY DIAN, LIN ZE- HUA, PAN SHEN-YUAN (1990) The breeding of the silkworm varieties "57A. 57B" "24.46" and their hybrids for both spring and autumn rearing. *Canye Kexue*, 16(1), 15-20.
- HE YI, SIMA Y-H, JIANG D-X & DAI P. (1991) Breeding of the silkworm varieties for summer and autumn rearing "Xuhua", "Qiuxing" and their hybrids. *Canye Kexue*, 17(4), 200-207.
- HE Y. & OSHIKI T. (1984) Study on cross breeding of a robust silkworm race for summer and autumn rearing at low latitude area in China. *J. Seric. Sci. Jpn.* 53, 320-324.

- HUANG P. J., CHEN J. H., HONG D. H. & CHEN C. N. (1979) Preliminary study on the inheritance of tolerance to high temperature in some silkworm strains. *J. Agric. Assoc. China* 105, 23-29.
- KATO M., NAGAYASU K., NIINAKI O., HARA W., WATANABE A. (1989) Study on resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to high temperature. In: Proc. Of the 6th Internatl. Congr. of SABRAO (11) 953-956.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New Technology of silkworm rearing. Bull. No. 2, CSRTI, Mysore, p-23.
- KRISHNA RAO, SHIVAMALLU M. L. & VENKATARAMU (1996) Evaluation of bivoltine silkworm races for high temperature tolerance. In: Seric. Sci facing 21st Cent. Int. Symp. Seric. Sci. Hangzhou China, Oct 6-10, p 90.
- MANO Y. (1994) Comprehensive Report on Silkworm Breeding, pp 180. Report submitted to CSB, Bangalore.
- NAKADA T. (1989) On the measurement of cocoon shape by use of image processing method, with an application to the sex-determination of silkworm, *Bombyx mori* L. Proc. 6th Internal. Cong. SABRAO pp: 957-960.
- NAKADA T. (1991) On the sex-linkage of cocoon shape in the silkworm. Abstr. 61st Cong. Jap. Soc. Seric. Sci., p. 50.
- NAKADA T. (1992a) Sequence of some cocoon traits in the progeny tests after crossing between wild and domesticated silkworm. In: Wild Silkmths, H. Akai, Y. Kato, M. Kiuchi & J. Kobayashi (Eds.) pp. 98-104.
- NAKADA T. (1992b) The principal component analysis regarding cocoon shape in the silkworm with reference to the difference between female and male. Abstr., 62nd Cong. Jap. Soc. Seric. Sci. P. 92.
- NAKADA T. (1993) Genetic differentiation of cocoon shape in the silkworm, *Bombyx mori* L. Abstr., 17th Internat. Cong. Genetics, p. 224.
- NAKADA T. (1994) On the cocoon shape measurement and its statistical analysis in the silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 33(1): 100-102.
- NASEEMA BEGUM, REKHA M., AHSAN M. M. I SUDHAKARA RAO P. (2000) Evaluation of two promising hybrids i.e. HSP1 (A3 × 935^F) and HSP2 (A3 × 916B) in the silkworm, *Bombyx mori* L. Int. J. Indust. Entomol. Vol. 1(2): 103-109.
- OHI H., YAMASHITA (1977) On the breeding of silkworm races J137 and C137. Bull. of Sericult. Exp. Sta. 27: 97-139.
- RAMESH C. R. & SUBRAMANYA G. (1996) Breeding of superior viable races of silkworm, *Bombyx mori* for tropics. In Seric Sci facing 21st Cent' Int Symp Seric Sci Hangzhou China Oct 6-10, p 109.
- RAVINDRA SINGH, KALPANA G. V., SUDHAKARA RAO P. & AHSAN M. M. (1998) Studies on cocoon shapes in different crosses of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric. 37(1): 85-88.
- RAVINDRA SINGH, RAGHAVENDRA RAO D., PREMALATHA V., SIPRA MONDAL, KARIAPPA B. K., JAYASWAL K. P. & DATTA R. K. (2001a) Manifestation of hybrid vigour and cocoon shape variability in F1 hybrids of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Int. J. Indust. Entomol. 2(2), pp 133-139.
- RAVINDRA SINGH, RACHINA GOEL, RAGHAVENDRA RAO D., REKHA M., PREMALATHA V., AHSAN M. M. & R. K. DATTA (2001 b) Evaluation of multivoltine × bivoltine F1 hybrids of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. in two different seasons. Sericologia 41(2): 231-238.
- SOKAL R. R. & ROHLF F. J. (1969): Biometry, p 368-380.
- SHAO RULI (1989) Breeding of Lantian × Baiyun, new summer-autumn silkworm variety. Science of Sericulture. 15(3), 125-129.
- SHAO YUE-HUA, LI WEI-BIN, XIA JIAN-QUO & CAO JIN-RU (1987) The breeding of the mulberry silkworm varieties, "Xinhang" and "Keming" for summer-autumn rearing. Canye Kexue 13(1), 15-20.

- SHIBUKAWA K. (1970) *Acta Sericologia* 16:1.
- SHIROTA T. (1992) Selection of healthy silkworm strain through high temperature rearing of fifth instar larvae. *Reports of the Silk Sci. Res. Inst.* 40: 33-40.
- SURESH KUMAR N. & YAMAMOTO T. (1995) Maternal effect of high temperature in F1 hybrids between polyvoltine and bivoltine silkworm race. Paper presented at the Annual conference held on 9/ 10-11-98 at Nigata, Japan.
- SURESH KUMAR N., KISHORE KUMAR C. M., BASAVARAJA H. K., MALREDDY N., RAMESH BABU M. & DATTA R. K. (1999) Comparative performance of robust and productive bivoltine hybrids of *Bombyx mori* L. under high temperature conditions. *Sericologia* 39, 567-571.
- TAKEUCHI Y., KOSAKA T., UEDA S. (1964) The effects of rearing temperature upon the amount of food ingested and digested. *Technical Bull. of Sericult. Exp. Sta.* 84: 1-12.
- TAZIMA Y., OHNUMA A. (1995) Preliminary experiments on the breeding procedure for synthesising a high temperature resistant commercial strain of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Rep Sil Sci. Res. Inst.*, 43: 16-17.
- ZHANG PEI-ZHEN, JI PING SHEN XUE-HUA & CHEN XIN-HUA (1994) Breeding of variety "Qiufeng × Baiyu" for summer-autumn rearing. *Canye Kexue*, 20(1), 17-25.

PERFORMANCES COMPAREES D'HYBRIDES BIVOLTINS THERMO-TOLERANTS DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. A DIFFERENTES CONDITIONS DE TEMPERATURE ET D'HUMIDITE

A. NASEEMA BEGUM, M. M. AHSAN, H. K. BASAVARAJA & M. REKHA

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

*Nous avons analysé dix hybrides du ver à soie *Bombyx mori* L. exposés à trois combinaisons différentes de température et d'humidité relative, c'est à dire $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $75 \pm 5\%$ d'HR ; $31 \pm 1^\circ \text{C}$ et $85 \pm 5\%$ d'HR et $36 \pm 1^\circ \text{C}$ et $85 \pm 5\%$ d'HR pour huit caractères économiques, c'est à dire durée du 5^{ème} âge, rendement pour 10 000 larves en nombre (survie des cocons), poids du cocon, poids de la coque, richesse soyeuse, longueur moyenne du filament, pourcentage de soie grège et pourcentage de dévidabilité. La performance des hybrides à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et à $31 \pm 1^\circ \text{C}$ est comparable. L'effet de la température est significatif pour tous les caractères sauf pour la richesse soyeuse ($P < 0,05$). L'effet d'interaction (température $\times$ hybride) est significatif pour la survie ($P < 0,05$). A une température de $36 \pm 1^\circ \text{C}$, tous les hybrides présentent une survie du cocon légèrement meilleure par comparaison à l'hybride témoin, KA $\times$ NB4D2. La meilleure performance de ces dix hybrides à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ pourrait être due à l'effet maternel de thermo-tolérance quand on utilise un parent femelle plus tolérant. L'effet nocif de la température élevée et de l'humidité élevée est plus prononcé chez KA $\times$ NB4D2, comme le prouve la faible survie des cocons (2944 à $36 \pm 1^\circ \text{C}$). Cependant, deux hybrides, c'est à dire AHT $\times$ FHT (8996) et BHT $\times$ GHT (9155) présentent une survie de cocons plus élevée par comparaison aux autres hybrides à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ et $85 \pm 5\%$ d'HR.*

INTRODUCTION

Au cours des années, la recherche séricicole en Inde a permis une augmentation de la production de soie et a placé l'Inde près de la Chine, dans le paysage mondial de la soie mais la qualité de la soie est demeurée mauvaise à cause des défauts intrinsèques des cocons poly $\times$ bivoltins (Datta, 1984). Pour surmonter ce problème de qualité et produire de la soie de qualité internationale, il est absolument nécessaire d'élever des vers à soie bivoltins. L'Inde en tant que pays tropical n'est pas propice à l'élevage des vers à soie bivoltins qui sont d'origine tempérée, pendant toute l'année.

Récemment, des hybrides très productifs, de qualité supérieure bi $\times$ bi ont été mis au point pour l'exploitation commerciale de la soie (Basavaraja, 1995). Mais ces hybrides n'ont été validés que pour l'élevage pendant les saisons favorables de l'année (août – février). Ainsi, on a besoin de lignées de vers à soie tolérantes au climat tropical fluctuant et résistantes aux maladies pour l'élevage pendant toute l'année en Inde (Naseema et coll., 2000). Dans les pays avancés sur le plan séricicole comme la Chine, des lignées de vers à soie bivoltins distincts adaptées à l'élevage d'été et d'automne ont été mises au point (Shao et coll., 1987, 1990, He et coll., 1991, Zhang et coll.). Les scientifiques japonais ont étudié l'influence de la température élevée sur la croissance et le développement du ver à soie (Takeuchi et coll., 1964, Ohi et Yamashita, 1977, Huang et coll., 1979, He et Oshiki, 1984). Kato et coll., (1989) ont aussi étudié l'effet nocif de la température chez le ver à soie et rapporté que la

tolérance à la température est un caractère héréditaire et qu'il serait possible de mettre au point des lignées de vers à soie thermo-tolérants. De plus, Tazima et Ohnuma (1995) ont confirmé le caractère héréditaire de la thermo-tolérance. d'après la survie du ver à soie exposé à une température élevée pendant le cinquième âge. Suresh Kumar et Yamamoto (1995) ont aussi expliqué l'hérédité maternelle de la thermo-tolérance grâce à l'exposition de race pures et de leurs hybrides à une température élevée.

Dans cette étude, nous avons essayé d'évaluer les performances d'hybrides venant d'être mis au point avec trois traitements de température et d'humidité différents afin de sélectionner des hybrides tolérants pour permettre un élevage pendant toute l'année.

MATERIELS ET METHODES

Quatre lignées bivoltines thermo-tolérantes, c'est à dire AHT, BHT (cocon ovale) sont croisées avec onze lignées productives (cocons cintrés) et F HT, G HT, (cintrés) sont croisées avec neuf lignées productives ovales et les lignées ovales thermo-tolérantes sont croisées avec des lignées cintrées thermo-tolérantes : on prépare, on évalue et on sélectionne un ensemble de quarante quatre hybrides avec un indice d'évaluation supérieur à 50. Dix hybrides de vers à soie, c'est à dire A × CSR5, A × F, A × B61, AHT × 935E, B × G, A × G, B × F, G × CSR12, G × A1 et AHT × CSR13 (sélectionnés sur quarante quatre hybrides d'après une valeur pour l'indice d'évaluation supérieure à 50) et l'hybride témoin KA × NB4D2 forment le matériel expérimental de cette étude. Les parents des hybrides sélectionnés et leurs caractéristiques sont les suivantes : A HT, A1, B HT, KA, CSR12, CSR13 (cocon ovale) et CSR5, NB4D2, F HT, G HT, B61, 935 E (cintré).

Les caractéristiques des parents des hybrides sélectionnés sont les suivantes :

No. de série	Lignée	Marquage Larvaire	Forme du cocon	Taux de pupaison	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse
1	A HT	Neutre	Ovale	94.6	1.629	0.310	19.0
2	A1	Neutre	Ovale	92.6	1.704	0.339	19.4
3	BHT	Neutre	Ovale	91.3	1.705	0.352	20.6
4	KA	Neutre	Ovale	90.5	1.621	0.322	19.8
5	CSR12	Limité au sexe	Ovale	86.0	1.868	0.468	24.5
6	CSR13	Neutre	Ovale	83.3	1.641	0.362	22.05
7	F HT	Usuel	Cintré	91.3	1.602	0.313	19.5
8	NB4D2	Usuel	Cintré	92.3	1.653	0.320	19.4
9	CSR5	Neutre	Cintré	83.5	1.840	0.430	23.8
10	GHT	Marqué	Cintré	93.3	1.605	0.309	19.3
11	B61	Marqué	Cintré	75.3	1.579	0.309	19.6
12	935 E	Marqué	Cintré	90.7	1.628	0.319	19.6

Les hybrides sont soumis à trois traitements différents, c'est à dire $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $75 \pm 5\%$ d'HR, $31 \pm 1^\circ \text{C}$ et $85 \pm 5\%$ d'HR et $36 \pm 1^\circ \text{C}$ et $85 \pm 5\%$ d'HR. Les vers à soie hybrides sont exposés à une température constante de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $31 \pm 1^\circ \text{C}$ du moment de la levée jusqu'au filage avec les deux premiers traitements de température. Mais avec le troisième traitement de température, les hybrides de vers à soie sont élevés à partir de la levée jusqu'au deuxième jour du cinquième âge à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $75 \pm 5\%$ d'HR suivis par un choc de température à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant six heures chaque jour de 10 heures à 16 heures jusqu'au filage. Après le filage, les cocons sont ramenés à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $85 \pm 5\%$ d'HR. On poursuit l'élevage en adoptant la technique habituelle (Krishnaswami, 1978). Après la pupaison, les cocons sont retirés des encabanages le 6ème jour. Les cocons sont coupés et on enregistre le nombre total de chrysalides vivantes. Les observations sont enregistrées sur la durée larvaire, le nombre de chrysalides ayant survécu, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, la longueur moyenne du filament, le % de soie grège et le % de dévidabilité. Le poids de dix cocons vivants et de dix coques est enregistré pour calculer le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse de chaque hybride. Sur les cocons hybrides élevés à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et à $31 \pm 1^\circ \text{C}$, on sélectionne soixante cocons par répétition et un total de 180 cocons est dévidé avec une machine de dévidage multibouts du *Central Sericultural Research & Training Institute*, à Mysore pour étudier les caractères de dévidage, c'est à dire la longueur moyenne du filament, le % de soie grège et le % de dévidabilité.

Cent cocons sont sélectionnés au hasard à partir de dix hybrides pour la mesure de la longueur du cocon, la largeur du cocon, et pour la détermination du rapport longueur / largeur de chaque hybride. La longueur et la largeur des cocons sont mesurées en utilisant des pieds à coulisse. La variation de la forme du cocon est déterminée d'après un test d'uniformité basé sur l'écart type (Mano, 1994). Le rapport longueur / largeur du cocon, son écart type et le coefficient de variation de chaque cocon sont pris en compte pour le test d'uniformité des cocons (Nakada, 1989, 1991, 1992a, 1992b, 1993, 1994). Les hybrides présentant un écart type inférieur à huit sont considérés de forme uniforme (Ravindra Singh et coll., 1998, 2001a et 2001b).

Les données sur l'élevage et le dévidage des hybrides élevés selon trois traitements de température et d'humidité différents sont analysées de manière statistique grâce à la méthode d'analyse de variance (Sokal et Rohlf, 1969).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des hybrides soumis à trois différents traitements de température sont présentés dans les Tableaux I, II et III. La performance des hybrides sélectionnés avec trois traitements de température différents est présentée dans les figures 1 à 5.

En Chine, les lignées de vers à soie adaptées à l'élevage d'été et d'automne ont été mises au point et exploitées commercialement (Shao et coll., 1987, 1990, Shao ruli, 1989, He et coll., 1990, He et coll., 1991, Zhang et coll., 1994). Un hybride de ver à soie bivoltin robuste CSR18 × CSR19, a été mis au point pour l'élevage d'été en Inde (Datta et coll., 2000). Deux lignées de vers à soie tolérant la température élevée, c'est à dire NP2 et SP2 ont été mises au point pour l'élevage dans les zones climatiques tropicales du Karnataka, en Inde (Krishna Rao et coll., 1996). Ramesh et coll., (1996) ont obtenu des hybrides de vers à soie à la survie élevée et aux caractères de productivité moyens pour l'élevage sous les tropiques. D'après les études comparatives sur la performance des hybrides de vers à soie robustes et productifs à une température élevée ($36 \pm 1^\circ \text{C}$ et $80 \pm 5\%$), Suresh Kumar et coll., (1999) ont signalé que les hybrides productifs sont plus sensibles à une température et une humidité élevées que les hybrides robustes.

Dans cette étude, la performance moyenne des hybrides élevés à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ et $31 \pm 1^\circ \text{C}$ est comparable tandis qu'à $36 \pm 1^\circ \text{C}$, les hybrides présentent une variation du nombre de cocons qui survivent allant de 4611 à 9155. Les effets nocifs de la température élevée et de l'humidité élevée sont plus prononcés chez l'hybride témoin KA × NB4D2, comme le prouve le nombre des survivants

(2944). L'interaction température / hybrides présente une variation significative pour le rendement des cocons en nombre ($P < 0,05$). Mais le nombre un peu plus élevé de pupaison observé chez les hybrides à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ pourrait être dû au parent femelle thermo-tolérant et les résultats concordent avec ceux de Suresh Kumar et coll., (1999) qui ont montré l'effet nocif de la température élevée et de l'humidité élevée sur les lignées productives par comparaison aux hybrides robustes.

L'étude est aussi en accord avec les observations de Shibukawa (1965) qui a montré que les hybrides ont de meilleures performances avec les lignées sélectionnées à une température élevée qu'avec les lignées sélectionnées à une température normale. Dans cette étude, la meilleure performance des hybrides à $36 \pm 1^\circ \text{C}$ pourrait être due à l'hérédité de la thermo-tolérance par le parent femelle. Cela confirme les résultats de Shirota (1992), Tazima et Ohuma (1995) qui ont confirmé l'hérédité génétique de la thermo-tolérance par rapport à la survie du ver à soie élevé à 36°C . D'après notre étude, deux hybrides thermo-tolérants AHT $\times$ FHT et BHT $\times$ GHT pourraient être utilisés comme matériaux de lignage pour la mise au point de nouvelles lignées / hybrides bivoltines. Les hybrides pourraient aussi être recommandés pour l'élevage pendant toute l'année après évaluation sur le terrain.

TRANSFORMATION OF GLYCININ GENE INTO MULBERRY AND IDENTIFICATION OF THE TRANSGENIC PLANTS

JIANZHONG TAN^{1,2}, CHENGFU LOU¹ & MINGQI ZHONG¹

1) Department of Sericulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.
Tel: 0086-571-86971307

2) Department of Sericulture, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

*As a potentially superior method to change mulberry characteristics, genetic engineering methods were applied extensively. Based on the mulberry leaf culture technique for plant regeneration, plant expression vector system that is *Agrobacterium tumefaciens* carrying glycinin gene AlaB1b was constructed, and transformed into mulberry. Results of PCR Southern and DNA hybridization showed that glycinin gene AlaB1b was introduced into mulberry.*

INTRODUCTION

Soybean seed is rich in protein, 70% of which is glycinin. Compared with most cereal plant seed protein, soybean protein contains higher percentage of glycerin, therefore it is an important protein resource. Soybean protein usually is one of very important nutrition components in silkworm artificial diet and a highly valuable nutrient for silkworm. In order to transform protein gene into mulberry, Japanese scholar, Hirano *et al.*, cloned basic 7s Globulin gene from soybean seed and constructed expression vector with the desired genes, then studied the genetic transformation to tobacco and mulberry respectively. Transgenic tobacco was finally obtained; unfortunately, transgenic mulberry failed (Kagawa *et al.*, 1989, ISES, Japan, 1997). On the basis of constructing plant expression vector with glycinin AlaB1b subunit gene and the engineered *Agrobacterium tumefaciens*, we introduced the glycinin gene into mulberry plants successfully with the use of an *Agrobacterium tumefaciens* vector system. It was confirmed by the molecular biology and protein chemistry identification of the transgenic plants.

MATERIALS AND METHODS

1. Plant material:

Mulberry leaf tissues were cultured according to requirement of leaf tissue culture. Young leaves of test-tube Shinichinose, a variety of *Morus alba*, were cut and transferred onto MS differentiation medium (MS + BA25 + NAA 0.1~0.3+1% sucrose + 1% fructose + 1% glucose) in a controlled cabinet under the condition of 25° C, 2000-3000lx and 12D/12R. Thus cultured young leaves were used as genetic transformation receptor material.

2. *Agrobacterium tumefaciens*:

The vectors of genetic transformation to mulberry were *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 and C58cl carrying the desired gene pBI-Gly, its structure is shown in figure 1. First, *Agrobacterium tumefaciens* was streak-cultured and mobilized in LB plate with Km/Rif/Str at 28~30° C for 40~48h, single colonies were transferred into LB liquid medium with the same

antibiotics and cultivated oscillatly (28~30° C, 120rpm). *Agrobacterium tumefaciens* suspension in logarithmically growing stage was obtained, was taken and diluted 3~5 times with MS differentiation medium to infect the receptor material.

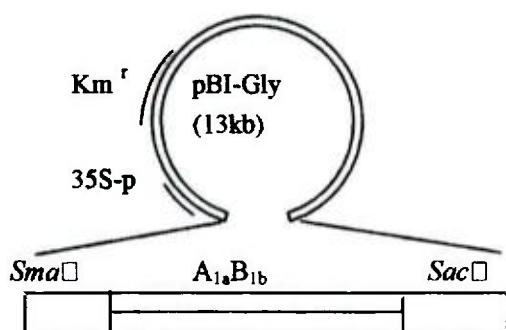


Fig. 1. Vector pBI-Gly for plant transformation.

Fig. 1. Vecteur pBI-Gly pour la transformation de la plante.

3. Genetic transformation and screening:

The pre-treated leaf-discs were immersed into the above-mentioned *Agrobacterium tumefaciens* suspension for 5-10 min, then blotted dry with sterile filter paper to remove excessive bacteria. After co-cultivation in differentiation medium for 24~48h, the infected leaves were transferred onto the differentiation medium with 400~500mg/ l Cef (or Cab) and 25~30mg/ l Km for screening cultivation, these leaves were subcultured every 5~7 days until the leaf-disc differentiated and adventitious buds formed. The adventitious buds with 2~3cm length were transferred into the rhizogenesis medium with 100mg/L Cef and 10mg/L Km for rooting, finally the complete plantlets were formed.

4. PCR-Southern blotting:

The genome DNA was extracted from Km resistant leaves according to the method reported by Li *et al.*, (1996). Based on the reported cDNA sequence of glycinin A1aB1b (Utsumi S. *et al.*, 1987), the specific PCR primer was synthesized. The 5'-end primer sequence is: 5'-TGCTTCGCTTCAGTTCCAG-3'; the 3'-end primer sequence is: 5'-TTCCTGGGGTCTTTGT TGCT-3'. The designed amplification fragment is 767 bp in length. Southern blotting was carried out according to the guideline and references of random primer label kit (BOEHRINGER MANNHEIM) (Li Debao *et al.*, 1996; Sambrook *et al.*, 1989). The *Nde* I+*Eco*RI fragment of glycinin A1aB1b gene (pUC-Gly) was used as template, the probe was labeled with promega-a-Gene® labeling system and α - ^{32} P-dATP.

5. RNA dot blotting:

Total RNA was extracted from the Km resistant leaves with Trizol method. Total RNA of pUC-Gly and untransformed mulberry leaves were used as positive and negative control respectively. Based on the method of Li (1996), the dot blotting was performed in a volume of 20 μ l containing 10 μ l total RNA sample and 10 μ l metamorphic buffer on hybond-XL membrane. The procedure of probe labeling, blotting and identification were the same as described above.

6. SDS-PAGE:

1g fresh leaves from transgenic seedling added with 3ml buffer was homogenized and centrifuged at 10000rpm for 15 minutes at room temperature. Supernatant was boiled for 2 min, cooled, and

centrifuged again for 10 min under the same conditions. The final supernatant was directly run in electrophoresis. SDS-PAGE gel preparation, electrophoresis examination and mapping analyses were carried out according to the method reported by Sambrook *et al.*, (1989).

RESULTS AND ANALYSES

1. Seedling with Km resistance and regenerated strains:

The transgenic seedling were screened by the Km^r selective marker gene. In order to construct plant expression vector, glycinin (AlaB1b sub-unit) gene instead of pBI-121 plasmid's β -glucuronidase was used in the present research. Before the genetic transformation experiment, the effects of all the 5 antibiotics, that is Km, Rif, Str, Cef, and Cab on the adventitious bud differentiation of mulberry leaves and Cef, and Cab's inhibition on LBA4404 and C58cl were investigated based on the resistant character of transformation system and the *Agrobacterium tumefaciens*. The growing characters of engineered *Agrobacterium tumefaciens* were examined and the leaf-disc transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was constructed. According to the above-described genetic transformation method, 22 strains with Km resistant character were obtained by screening a large number of receptor materials.

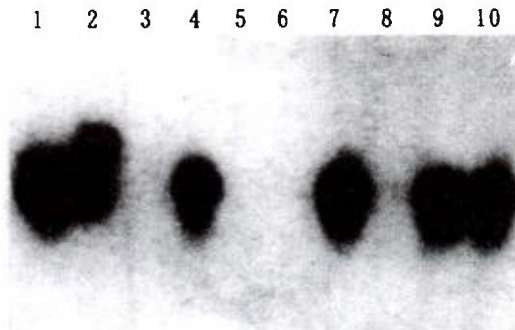


Fig.2 Identification of the Km-resistant shoots by PCR-Southern hybridization.

Lane 1, 2: CK⁺ (pUC-Gly, soybean genomic DNA);
Lane 3: CK⁻ (non-transformed);
Lane 4~10: Km-resistant shoots (strains numbered orderly t42, t5, t51, t41, t24, t23, t21)

Fig. 2. Identification des pousses résistantes à Km par hybridation PCR Southern.

Trajets 1, 2 : CK⁺ (pUC-Gly, ADN génomique du grain de soja), Trajet 3 : CK⁻ (non transformé).

Trajets 4-10 : Pousses résistantes à Km (souches numérotées dans l'ordre t42, t5, t51, t41, t24, t23, t21).

2. Identification of PCR- Southern blotting of transgenic seedlings:

In order to identify whether the glycinin has been transferred into the Km resistant strains, genomic DNA extracted from leaves of Km resistant strains was identified by PCR-Southern hybridization. As a result, Genomic DNA from four strains can be amplified steadily and a specific PCR fragment (about 0.8 kb) can be obtained. In order to further confirm the truth of the PCR amplification fragment, all the four strains were detected for hybridization signal by Southern blotting as shown in figure 2, which indicated that glycinin AlaB1b subunit gene had been integrated into the mulberry genome.

3. Identification of transgenic seedling by RNA dot blotting:

The results of RNA dot blotting of Km resistant seedlings are shown in figure 3. Hybridization signals were detected in transgenic seedlings except t5 and t51. Results of molecular biological identification suggested that glycinin gene has been truly transferred into mulberry genome, and its expression (mRNA) was detected. Moreover, among resistant seedlings examined, some were found to be "false positive".

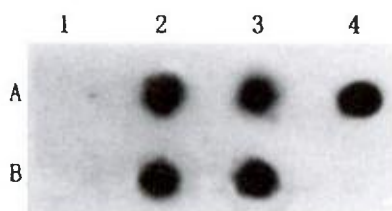


Fig. 3. RNA Dot blotting for the Km-resistant shoots.

A1~3: Km-resistant shoots (t5, t23, t41).
A4: CK⁺ (pUC-Gly).
B1~3: Km-resistant shoots (t51, t42, t21)
B4: CK (non-transformed)

Fig. 3. Hybridation sur tache de l'ARN pour les pousses résistantes à Km.

A1~3: Pousses résistantes à Km (t5, t23, t41).
A4: CK⁺ (pUC-Gly).
B1~3: Pousses résistantes à Km (t51, t42, t21).
B4: Ck (non transformé).

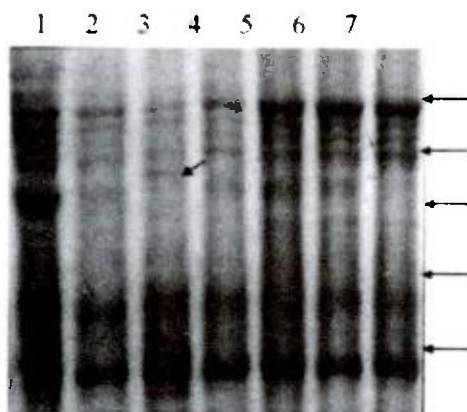


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of total protein from the leaves of transgenic plants

(Lane 1~7 : numbered orderly CK, t44, t23, t41, t51, t42, t21)

Fig. 4. Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide avec dodécylsulfate de sodium des protéines totales des feuilles des plantes transgéniques.

(Trajets 1-7 : numérotés dans l'ordre CK, t44, t23, t41, t51, t42, t21).

4. Analysis of protein component of transgenic seedling:

In order to further understand expression or accumulation of glycinin gene in transgenic seedlings, the total proteins from leaves of transgenic mulberry and control mulberry were separated by SDS-PAGE, and mapping was made (figure 4). Results from electrophoresis pattern indicated that there were little differences between t23 strain and the control, except there was an extra component in labeled mol wt around 45kb in the transgenic mulberry, which was not found in bands of the control and other transgenic seedlings. So far, it is not confirmed whether the band is a component of glycinin subunit A_{1a}B_{1b}, or whether it was caused by an inserted gene resulting in change of original component. Furthermore, the electrophoresis results showed that total protein extraction of mulberry leaf, pre-treatment techniques, and SDS-PAGE techniques adopted in the present research could clearly identify more than 30 protein components, which might be valuable in taxonomic evidence of plant biochemistry (protein chemistry) for *Morus*.

DISCUSSION

Based on the investigation of the influence factors on mulberry leaf culture and leaf-disc genetic transformation, a better mulberry genetic transformation system was established and two strains with Km resistant character were obtained by screening a large number of receptor materials. By PCR-Southern, RNA dot blotting and analysis of protein chemistry, it was confirmed that glycinin A_{1a}B_{1b} was introduced into mulberry successfully and the expression of A_{1a}B_{1b}-mRNA was detected in mulberry leaves. This is the first report on successful genetic transformation among heterologous plants in mulberry.

The leaf-disc method mediated by *Agrobacterium tumefaciens* is commonly used in transgenic research, especially in dicotyls. Mulberry, a perennial woody plant, is sensitive to *Agrobacterium tumefaciens*. Most researchers have adopted this method to study the mulberry genetic transformation, and there are reports on the successful introduction of antimicrobial peptide gene into mulberry (Li Danqing *et al.*, 1990; Wang Yong, *et al.*, 1998). Based on previous research result, we had transferred glycinin gene into *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 and C58cl and obtained transgenic strains using *Agrobacterium tumefaciens* mediated method. However, the present system required a much larger number of receptor materials, longer transformation period but less transgenic strains were obtained if compared with model of tobacco and potato. Therefore, transformation gene technique mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, including regeneration system, transformation system and transformation method needs to be further improved.

From available research reports, leaf (leaf-disc or cotyledon) is always used as initiative receptor material in mulberry leaf-disc transformation method. In order to further increase the efficiency of mulberry genetic transformation, it is necessary to consider other transformation methods in transforming heterologous gene into mulberry though mulberry leaf can provide abundant identical genetic material and regenerative strains are easy to obtain if compared with protoplasts, suspended cells, callus tissues. Recently, the transformation system using stem apex as receptor material has succeeded in more than 10 plant species, such as vegetable and forest crop etc. Because growing point of explants such as plant stem apex, axillary bud is used, which is easy to culture and free of re-differentiation process, this system avoids the difficulty of regeneration and the dependence of genotype, and shows many advantages in transformation efficiency, transformation cycle, transformant, and genetic steadiness of filial generation. If stem apex transformation method could be applied to mulberry and other plants with difficult regeneration, the transgenic efficiency would be greatly improved. In addition, direct transformation method, such as particle bombardment technique etc., has been used in monocotyledons and dicotyledons. Machii (1996) bombarded suspension callus with gene gun and transient expression of exogenous genes was detected into mulberry. More attention might be paid in this field.

The present research had constructed plant expression vector with pBI-121 plasmid and obtained seedlings with Km resistance from receptor material. Theoretically, individual with Km resistance is a transgenic seedling. However, many factors such as selective pressure intensity and period, interval duration of subculture and receptor material etc., might affect the genetic transformation, which result in many "pseudo-transformant" in our experiments. The so-called pseudo-transformant means that the strain from selective medium does not transfer exogenous gene, but escapes the influence of selective pressure. Jia *et al.* (1992) believed that pseudo-transformant is a common phenomenon in genetic transformation experiments. The possible cause could be: Firstly, exogenous selective resistant gene transient expression in explant cells or steady expression in some epidermis cells of explant provides a barrier to avoid the influence of selective pressure and continual fission and differentiation; Secondly, some types of plants of receptor material have intrinsic resistance to become "pseudo transformant"; Finally, selective pressure is added too late or little which could result in non-transgenic cells fission and differentiation. According to the results of molecular biology identification of plant strains with Km resistance, the proportion of transgenic seedling to

pseudo-transformant is high in the present experiment, which might be attributed to the receptor material. Because test-tube seedlings' young leaves were pre-treated for 3~5 days, co-cultured for 1~2 days, antibacterial-cultured primarily for 5~7 days and screened with Km, some explants (leaves) possibly already formed adventitious buds which are much less sensitive to Km. Therefore, when defining the Km selective time and intensity, we must not only assure a proper proportion of receptor material to develop adventitious buds, but also maximally reduce the amount of positive pseudo-transformant. It is necessary to screen by second time for rooting ability of transgenic seedling under the Km selective pressure.

So far, the research of transforming exogenous genes into mulberry was mainly concentrated on antimicrobial peptide genetic transformation, which might be due to the limited source of desired gene and the specificity of sericulture production. The present work of transforming exogenous glycinin gene into mulberry developed a new strategy in the improvement of leaf quality in mulberry, through plant gene engineering. There were few reports on other valuable genes transferred into mulberry, though there are abundant mulberry resources in China. It should be an interesting research field to isolate desired genes with specific utilization and transfer into mulberry plant in molecular breeding. Furthermore, based on the results and experiences of other transgenic plants, we might explore application of some resistant genes, such as resistance to pests or adverse conditions, in mulberry and provide more valuable genes and efficient transformation systems for mulberry plant, to realize the goal to improve mulberry quality efficiently by gene engineering techniques.

REFERENCES

- INSTITUTE OF SERICULTURAL AND ENTOMOLOGICAL SCIENCE. Annual reports on experiment results and research planning. Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery in Japan, 1997.
- JIA SHIRONG, CAO DONGSUN. Transgenic plants Chinese bulletin of botany. 1992(9):3~15
- KAGAWA H., HIRANO H. Sequence of a cDNA encoding soybean basic 7S globulin. Nucleic Acids Res, 1989, 17:8868
- LI DANQING, XU FEI, HUANG ZIRAN, *Et al.* Transferring synthetic antibacterial peptide gene from Chinese oak silkworm into *Agrobacterium tumefaciens*. Sericultural Science, 1994, 20(1): 1~6
- LI DEBAO, ZHOU XUEPING, XU JIANPING, *et al.* Manipulation technique for gene engineering. Shanghai science and technology publishing house, 1996.
- MACHII H. Leaf disc transformation of mulberry by *Agrobacterium* Ti-plasmid. J Seri Sci Jpn, 1990, 59:105~110
- SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning (2nd ed). Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- UTSUMI S, KIM C, KOHNO M, *et al.* Polymorphism and expression of cDNAs encoding glycinin subunits. Agric Biol Chem. 1987, 51:3267~3273
- WANG YONG, JIA SHIRONG CHEN AIYU, *et al.* Transformation of mulberry cotyledons by cecropin gene and regeneration of transgenic plants resistant to *Pseudomonas solanacearum* dowson. Sericultural Science, 1998, 24(3): 136~142

INTEGRATION DU GENE DE LA GLYCININE CHEZ LE MURIER ET IDENTIFICATION DES PLANTS TRANSGENIQUES

JIANZHONG TAN^{1,2}, CHENGFU LOU¹ & MINGQI ZHONG¹

1) Department of Sericulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Chine,
Tel: 0086-571-86971307.

2) Department of Sericulture, Suzhou University, Suzhou 21551, Chine.

*Les méthodes de génie génétique ont été beaucoup utilisées pour changer les caractéristiques du mûrier. Grâce à la technique de la culture foliaire du mûrier pour la régénération de la plante, le vecteur d'expression **Agrobacterium tumefaciens** portant le gène *AlaB1b* de la glycine a été intégré chez le mûrier. Les résultats de la PCR (réaction en chaîne de la polymérase) Southern et d'hybridation de l'ADN montrent que le gène de la glycine *AlaB1b* a été introduit chez le mûrier.*

INTRODUCTION

Le grain de soja est riche en protéines, constituées de 70 % de glycine. Comparée à la plupart des protéines des grains de céréales, la protéine du soja contient un pourcentage plus élevé de glycérine, c'est donc une importante source de protéines. La protéine de soja est généralement l'un des composants nutritionnels très importants de l'aliment artificiel du ver à soie et un nutriment de grande valeur pour le ver à soie. Pour intégrer le gène de la protéine dans le mûrier, le scientifique japonais, Hirano et coll., a cloné le gène de la globuline 7 à partir du grain de soja et construit un vecteur d'expression avec les gènes désirés, puis il a étudié la transformation génétique respectivement chez le tabac et le mûrier. On a finalement obtenu du tabac transgénique ; malheureusement, la transgénèse du mûrier n'a pas abouti (Kagawa et coll., 1989, ISES, Japon, 1997). Le gène de la sous-unité *AlaB1b* de la glycine a été introduit dans les plants de mûrier avec succès en utilisant comme système vecteur *Agrobacterium tumefaciens*. Ceci a été confirmé par la biologie moléculaire et l'identification des protéines des plantes transgéniques.

MATERIELS ET METHODES

1. Plantes :

Les tissus de la feuille de mûrier sont cultivés en suivant les étapes de la culture des tissus foliaires. Les jeunes feuilles de Shinichinose, une variété de *Morus alba* sont coupées et transférées sur un milieu de différenciation MS (MS + BA25 + NAA 0,1 à 0,3 + saccharose à 1 % + fructose à 1 % + glucose à 1 %) dans un local contrôlé à 25°C, avec 2000 à 3000 lx et une photopériode de 12 / 12. Les jeunes feuilles cultivées sont utilisées comme matériel récepteur de la transformation génétique.

2. *Agrobacterium tumefaciens* :

Les vecteurs de la transformation génétique du mûrier sont les souches LBA4404 et C58cl d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le gène désiré pBI-Gly, dont la structure est présentée dans la figure 1. Dans un premier temps, *Agrobacterium tumefaciens* est cultivé en bandes sur une couche

de LB avec Kanamycine (Km), Rifampicine (Rif) et Streptomycine (Str) à 28-30° C pendant 40 à 48h, les colonies isolées sont transférées dans du milieu liquide LB avec les mêmes antibiotiques et cultivées sous agitation (28 à 30° C, 120 tpm). On obtient et on dilue 3 à 5 fois la suspension d'*Agrobacterium tumefaciens* au stade de croissance logarithmique avec un milieu de différenciation MS pour infester le matériel récepteur.

3. Transformation génétique et analyse :

Les disques foliaires pré-traités sont immergés dans la suspension d'*Agrobacterium tumefaciens* mentionnée ci-dessus pendant 5 à 10 minutes, puis sont séchés sur du papier filtre stérile pour enlever les bactéries en excès. Après la co-culture dans un milieu de différenciation pendant 24 à 48 h., les feuilles infestées sont transférées sur le milieu de différenciation avec 400 à 500 mg / l de Cef (ou Cab) et 25 à 30 mg / l de Km pour la culture d'analyse. Ces feuilles sont mises en sous-culture tous les 5 à 7 jours jusqu'à ce que le disque foliaire se différencie et que les bourgeons adventifs se forment. Les bourgeons adventifs de 2 à 3 cm de longueur sont transférés dans le milieu de rhizogénèse avec 100 mg / l de Cef et 10 mg / l de Km pour le racinement et finalement les plants complets se forment.

4. Analyse PCR par buvardage Southern :

L'ADN du génome est extrait des feuilles résistantes à Km selon la méthode rapportée par Li et coll., (1996). D'après le rapport sur la séquence de l'ADNc de AlaB1b de la glycine (Utsumi S. et coll., 1987), on synthétise l'amorce PCR spécifique. La séquence de l'amorce de l'extrémité-5' est 5' - TGCTTCGCTTCAGTTCCAG-3' ; la séquence de l'amorce de l'extrémité 3' est 5'-TTCCTGGGGTCTTTGTTGCT-3'. Le fragment amplifié conçu fait 767 bp de longueur. On réalise l'analyse par empreinte Southern selon le mode d'emploi et les références du kit d'étiquetage de l'amorce aléatoire BOEHRINGER MANNHEIM (Li Debaio et coll., 1996 ; Sambrook et coll., 1989). Le fragment Nde I + EcoR I du gène AlaB1b de la glycine (pUC-Gly) est utilisé comme matrice. la sonde est étiquetée avec le système d'étiquetage Promega-a-Gene ® et α -³²P-dATP.

5. Hybridation sur tache de l'ARN :

L'ARN total est extrait des feuilles résistantes à Km par la méthode Trizol. L'ARN total de pUC-Gly et des feuilles de murier non transformées sont utilisés respectivement comme témoins positif et négatif. D'après la méthode de Li (1996), on réalise l'hybridation sur tache dans un volume de 20µl contenant 10µl d'échantillon total d'ARN et 10 µl de tampon sur une membrane Hybond-XL. Les procédures de marquage de la sonde, de buvardage et d'identification sont les mêmes que celles décrites plus haut.

6. SDS-PAGE :

On homogénéise et on centrifuge 1 g de feuilles fraîches à partir de plantules transgéniques auxquelles on a ajouté 3ml de tampon à 10 000 tpm pendant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant est bouilli pendant 2 minutes, refroidi et centrifugé à nouveau pendant 10 minutes dans les mêmes conditions. Le surnageant final est directement placé en électrophorèse. La préparation du gel de SDS-PAGE, l'examen de l'électrophorèse et les analyses de cartographie sont réalisés selon la méthode rapportée par Sambrook et coll., (1989).

RESULTATS ET ANALYSES

1. Plantules résistantes à la Kanamycine et souches régénérées :

Les plantules transgéniques sont criblées par le gène marqueur sélectif Km^r. Pour construire le vecteur d'expression de la plante, le gène de la glycine (sous-unité AlaB1b) a été utilisé au lieu du gène de la β -glucuronidase du plasmide pBI-121. Avant l'expérience de transformation génétique, on étudie les effets des 5 antibiotiques, c'est à dire de Km, Rif, Str, Cef et Cab sur la différenciation

du bourgeon adventif des feuilles de mûrier et l'inhibition de Cab sur LBA4404 et C56cl d'après le caractère résistant du système de transformation et d'*Agrobacterium tumefaciens*. On examine les caractères de croissance de l'*Agrobacterium tumefaciens* conçu et on construit le disque foliaire du système de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. Avec la méthode de transformation génétique décrite ci-dessus, on a obtenu 22 souches avec le caractère résistant Km en criblant un grand nombre de matériel récepteur.

2. Identification PCR - Southern des plantules transgéniques :

Pour déterminer si la glycinine a été transférée dans les souches résistantes à Km, on identifie l'ADN génomique extrait des feuilles des souches résistantes Km par hybridation Southern PCR. En conséquence, on a amplifié l'ADN génomique de quatre souches et obtenu un fragment PCR spécifique (environ 0,8 kb). Pour d'avantage confirmer la nature du fragment d'amplification PCR, on détecte le signal d'hybridation par empreinte Southern chez les quatre souches comme le montre la figure 2, ce qui indique que le gène de la sous-unité A1aB1 de la glycinine a été intégré dans le génome du mûrier.

3. Identification de la plantule transgénique par hybridation sur tache de l'ARN :

Les résultats de l'hybridation sur tache de l'ARN des plantules résistantes à Km sont présentés sur la figure 3. Les signaux d'hybridation sont détectés dans les plantules transgéniques sauf t5 et t51. Les résultats de l'identification moléculaire suggèrent que le gène de la glycinine a été vraiment transféré dans le génome du mûrier et son expression (ARNm) est détectée. De plus, parmi les plantules résistantes examinées, certaines s'avèrent être de "faux positifs".

4. Analyse des protéines des plantules transgéniques :

Pour mieux comprendre l'expression du gène de la glycinine dans les plantules transgéniques, les protéines totales du mûrier transgénique et du mûrier témoin sont séparées par SDS-PAGE et on obtient une cartographie (figure 4). Les résultats du profil électrophorétique indiquent qu'il y a peu de différences entre la souche t23 et le témoin, sauf qu'il y a un composant supplémentaire dont le poids moléculaire est autour de 45kb chez le mûrier transgénique que l'on ne trouve pas dans les bandes du témoin et des autres plantules transgéniques. Jusqu'à présent, il n'a pas été confirmé si la bande est un composant de la sous-unité A1aB1b de la glycinine ou si elle a été provoquée par un gène inséré provenant d'un changement d'un composant original. De plus, les résultats de l'électrophorèse montrent que l'extraction des protéines totales de la feuille du mûrier, les techniques de pre-traitement et les techniques de SDS-PAGE adoptées dans cette recherche pourraient permettre d'identifier clairement plus de 30 composants protéiques.

DISCUSSION

Après l'étude des facteurs influençant la culture de la feuille de mûrier et la transformation génétique du disque foliaire, on a établi un meilleur système de transformation génétique et on a obtenu deux souches avec le caractère résistant Km en analysant un grand nombre de matériaux récepteurs. Grâce à une PCR Southern, une hybridation sur tache de l'ARN et l'analyse des protéines, on confirme qu'A1aB1b de la glycinine est introduit dans le mûrier avec succès et on détecte l'expression de l'ARNm d'A1aB1b dans les feuilles de mûrier. C'est le premier rapport sur la transformation génétique réussie chez les plants hétérologues du mûrier.

La méthode du disque foliaire par la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* est couramment utilisée en transgénèse, surtout chez les dicotylédons. Le mûrier, une plante ligneuse vivace, est sensible à *Agrobacterium tumefaciens*. La plupart des chercheurs ont adopté cette méthode pour étudier la transformation génétique du mûrier et il y a quelques rapports sur la transformation réussie avec le gène d'un peptide antimicrobien chez le mûrier (Li Danqing et coll., 1990 ; Wang

Yong, et coll., 1998). D'après le résultat de recherches antérieures, nous avons transféré le gène de la glycine dans les souches LBA4404 et C58cl d'*Agrobacterium tumefaciens* et obtenu des souches transgéniques en utilisant une méthode ayant pour origine *Agrobacterium tumefaciens*. Cependant, le système actuel nécessite un plus grand nombre de matériaux récepteurs, une période de transformation plus longue mais on a obtenu moins de plants transgéniques si on le compare avec le tabac et la pomme de terre. Il faut donc encore améliorer la technique de transformation des gènes ayant pour origine *Agrobacterium tumefaciens*.

D'après les rapports disponibles, la feuille (le disque foliaire ou cotylédon) est toujours utilisée comme matériel récepteur initial avec la méthode de transformation du mûrier. Pour d'avantage augmenter l'efficacité de la transformation génétique, il est nécessaire de considérer d'autres méthodes de transformation bien que la feuille de mûrier puisse fournir un matériel génétique identique abondant et qu'il soit facile d'obtenir des souches régénérées avec elle par comparaison aux protoplastes, aux cellules en suspension, et aux tissus de cals. Récemment, le système de transformation utilisant le sommet de la tige comme matériel récepteur a réussi chez plus de 10 espèces de plantes de cultures végétale et forestière. Lorsqu'on utilise le point de croissance des explants tels que le sommet de la tige, le bourgeon axillaire, qui sont faciles à cultiver et exempts d'un processus de re-différentiation, on évite les difficultés de régénération et de dépendance du génotype ce qui présente de nombreux avantages pour l'efficacité de la transformation, le cycle de transformation, le transformant et la régularité génétique de la génération filiale. Si on pouvait appliquer la méthode de transformation du sommet de la tige chez le mûrier et d'autres plantes difficiles à régénérer, cela améliorerait grandement la transformation génétique. De plus la méthode de transformation directe, telle que la technique de bombardement des particules a été utilisée chez les monocotylédons et les dicotylédons. Machii (1996) a bombardé le cal par biolistique et a détecté l'expression transitoire des gènes exogènes chez le mûrier. Il faudrait accorder plus d'attention à ce domaine.

Nous avons construit le vecteur d'expression de la plante avec le plasmide pBI-121 et obtenu des plantules résistantes à la Kanamycine (Km) à partir du matériel récepteur. Théoriquement, l'individu avec la résistance Km est une plantule transgénique. Cependant, des facteurs nombreux tels que l'intensité de la pression sélective et la période, la durée de l'intervalle de la sous-culture et le matériel récepteur, pourraient avoir un effet sur la transformation génétique et générer de nombreux "pseudo-transformants" dans nos expériences. Le pseudo-transformant signifie que la souche du milieu sélectif n'a pas intégré le gène exogène mais échappe à l'influence de la pression de sélection. Jia et coll., (1992) pensent que la pseudo-transformation est un phénomène courant dans les expériences de transformation génétique. La cause possible pourrait être que : premièrement, l'expression sélective exogène transitoire du gène résistant dans les cellules de l'explant ou l'expression régulière dans les cellules de l'épiderme de l'explant fournit une barrière à la pression sélective ; deuxièmement, certains types de matériel récepteur des plantes résistent intrinsèquement à devenir "pseudo transformants" ; finalement, la pression sélective peut être trop faible ou trop tardive, ce qui pourrait entraîner une division et une différenciation des cellules non transgéniques. Selon les résultats de la biologie moléculaire, la proportion de plantules transgéniques par rapport aux pseudo-transformants est élevée dans cette expérience, qu'on pourrait attribuer au matériel récepteur. Parce que les jeunes feuilles des plantules dans les tubes à essai sont pré-traitées pendant 3 à 4 jours, co-cultivées pendant 1 à 2 jours, cultivées sans antibiotiques pendant 5 à 7 jours et analysées par rapport à la Kanamycine, il se peut que certains explants (feuilles) aient déjà formé des bourgeons adventifs qui sont beaucoup moins sensibles à Km. Quand on définit la période et l'intensité sélective de Km, il faut donc non seulement s'assurer d'une proportion correcte de matériel récepteur pour mettre au point les bourgeons adventifs, mais aussi pour réduire au maximum la quantité de pseudo-transformants positifs. Il est nécessaire de faire une 2^{ème} analyse par la capacité de racinement des plantules transgéniques sous pression sélective Km.

Jusqu'à présent, la recherche sur la transformation chez le mûrier s'est principalement concentrée sur la transformation génétique avec un gène de peptide anti-microbien, ce qui est dû à une limitation

des sources de gènes désirés et à la spécificité de la production séricicole. Cette étude de transformation par le gène de la glycinine chez le mûrier permet de mettre en place une nouvelle stratégie d'amélioration de la qualité de la feuille chez le mûrier par le génie génétique. Il existe peu de rapports sur d'autres gènes de valeur transférés chez le mûrier, bien qu'il existe d'abondantes ressources de mûrier en Chine. Il serait intéressant de faire des recherches sur l'isolement et le transfert des gènes désirés chez le plant de mûrier. De plus, d'après les résultats et les expériences chez d'autres plantes transgéniques, on pourrait explorer l'application de certains gènes de résistance, tels que ceux de la résistance aux parasites ou aux conditions néfastes et obtenir plus de gènes de valeur et de systèmes de transformation efficaces pour le plant de mûrier ce qui permettrait d'améliorer efficacement la qualité du mûrier grâce à des techniques de génie génétique.

EFFECT OF ESSENTIAL OILS OF *LITSEA CUBEBA* PERS. ON REARING PERFORMANCE OF MUGA SILK WORM (*ANTHERAEA ASSAMA*) AND SILK QUALITY - A NEW REPORT

S. N. CHOUDHURY

Department of Plant Sciences and Ecology, Regional Research Laboratory, Jorhat-785006, Assam, India.

Litsea cubeba Pers., locally known as "mejankari" in Assam, is a host plant of the "muga" silkworm (*Antheraea assama* W/w). A special type of silk is produced from this plant called "mejankari pat" found only in northeastern parts of India. The leaves of this plant contain essential oil at different concentrations (0.10-1.18%) and the major chemical constituents are also extremely variable (sabinene 15.9 - 49.8%).

Plant leaves which contain less amount of essential oil (0.1%), low percentages of major constituents such as sabinene (15.9%) and limonene (16.4%) were found to be superior for muga rearing. In contrast, higher percentage of essential oil (0.21-1.18) and more sabinene percentage (28.5 - 49.8) in the oil adversely affected the pre and post harvest characters of the muga silkworm. Silk produced from these plants was found in general to be fine lustrous creamy glossy and soft in nature but different shades were detected from different plants.

Keywords: *Litsea cubeba*, *Antheraea assama*, "muga" food plant, essential oil, sabinene, limonene.

INTRODUCTION

Litsea cubeba Pers., Lauraceae, is an evergreen, rarely deciduous tree or shrub, growing spontaneously in the Eastern Himalaya, Assam and Manipur up to an altitude of 2,700 m MSL (Satyavati *et al.* 1987; Hooker, 1885; Kanjilal, 1992). This tree is locally known as 'mejankari' in Assam, and considered as secondary food plant for "muga" silkworm (*Antheraea assama* W/w). The "muga" silk produced from this plant (locally familiar as "mejankari pat") has a unique glossy creamy character very attractive and has a lustre not matched by any silk produced elsewhere. This silk is several times costlier than the silk produced from other "muga" food plants (Choudhury, 1981).

Earlier *Persea bombycina*, *Litsea monopetala* and *Litsea cubeba* all these three food plants were used for rearing of "muga" worms but with the advancement of time, rearing of "muga" worms on *L. cubeba* has been ceased due to several factors. It is generally believed that effective rate of rearing (ERR%) on this plant is very low due to mortality of "muga" worms. Mortality of worms was speculated to be due to a high percentage of essential oil present in the leaf which affects the silk worm adversely (Raghavaia and Jayaramaiah, 1988). Further, literature survey indicated that *L. cubeba* has many chemotypes, and number of chemotypes were found in northeast India (Choudhury *et al.* 1998; Choudhury *et al.* 1998; Nath *et al.* 1994, Nath *et al.* 1988; Nath *et al.* 1996).

After independence of India, a gap of over 200 years, local muga rearers were not able to locate and identify the specific variety or chemotype(s) of *L. cubeba* for rearing, which explains why the silk production from this plant has almost disappeared.

In the present communication emphasis has been given on finding out a relationship between the essential oil and the composition of *L. cubeba* leaf on the rearing and quality of muga silk which have not been reported earlier.

MATERIALS AND METHODS

Litsea cubeba seedlings were collected from wild sources of Jorhat (Accession no. 1&2), Jogduar (Accession no. 3&4) areas of Jorhat district and Borahibari (Accession no. 5) area of Sibsagar district of Assam and were planted in four replications considering one plant for each replication in Regional Research Laboratory, Jorhat, Assam, India during March 1996. Essential oil extraction, qualitative and quantitative analysis of these plants and rearing of "muga" worms were carried out simultaneously. The qualitative and quantitative analysis of oil was published earlier (Choudhury *et al*, 1998) and present communication has been made on the rearing of "muga" silkworm.

Rearing of muga worms was carried out during October-November ("Katiya" brood) of 1998. Each grown up plant was covered by a nylon net (3.5 x 3.5 x 4.0 m) over a bamboo frame made according to the size of the net. Disease free layings (DFL) were first kept into a bamboo tray and 100 numbers of newly emerged 1st instar larvae were transferred to each replication and allowed to complete their larval period. Pre and post harvest characters as well as physical properties were determined considering 20 cocoons in each replication. Sericin and fibroin percentages of silk were determined by a modified method (Ahmed *et al*, 1998).

RESULTS AND DISCUSSION

Seedlings of *L. cubeba* were collected from a microclimatic area of Jorhat and Sibsagar districts of Assam within a radius of 30 km. Oil extracted from these plants exhibited wide variations. Amongst the various accessions, maximum oil from leaf was recorded in case of Jogduar A3 (1.18 %) and minimum in Borahibari A5 (0.10 %). It has been observed from the close scrutiny of the data presented in Table II that with the increase in essential oil in leaf, the larval weight significantly reduced from 8.50 to 5.05g. In contrast, larval duration increased (27.75 to 30.95 days) with the increased percentage of oil in leaves. Cocoon weight, shell weight, silk ratio and ERR percentages were found to be significantly better at lower oil percentages in leaves. Total filament length and non-breakable filament length of the cocoons were increased significantly, while silkworm were reared on the plants containing low content of essential oil. A negative correlation was also recorded between the essential oil percentage of leaf and filament length ($r = -0.80$) (Table III).

Persea bombycina and *Litsea monopetala* are both primary food plants of "muga" silkworm and contain essential oil at a very low concentration in leaves 0.08 to 0.12 % and traces respectively (Choudhury and Leclercq, 1995; Choudhury *et al*, 1997). In comparison to these two primary food plants, *Litsea cubeba* leaf contains essential oil at a very high percentage (0.10 to 1.18 %). Essential oil, regarded as secondary plant chemicals are defensive substances tending to render the plant repellent, toxic, or otherwise chemically unsuitable for utilization by insects (Grunwald, 1975; Robinson, 1974). Considering this fact, *Litsea cubeba* leaf with high percentage of essential oil may have an adverse effect on the "muga" silkworm. Further, as regards the nutritive value, *L. cubeba* leaf is much superior to *P. bombycina* and *L. monopetala* (Dutta *et al*, 1997). Thus inference may be drawn that *L. cubeba* with better nutrient value is not capable of producing healthy silkworm and better cocoons due to higher essential oil in leaf, though the quality of silk is much superior as compared to *P. bombycina* and *L. monopetala*.

Table I. Essential oil percentage and major constituents of *Litsea cubeba* collected from different sources of northeast India.

Tableau I. Pourcentage en huile essentielle et constituants principaux de *Litsea cubeba* récoltée dans différents lieux du nord est de l'Inde.

Places of collection	Essential oil % of leaves	α -pinene	β -pinene	Sabinene	1-8, cineole	Limonene
<i>Lieux de récolte</i>	<i>% d'huile essentielle des feuilles</i>	<i>α-pinene</i>	<i>β-pinene</i>	<i>Sabinene</i>	<i>1-8, cineole</i>	<i>Limonene</i>
Jorhat (Dist. Jorhat)						
Accession no. 1 / <i>Exemplaire no. 1</i>	0.21	8.7	7.3	42.9	7.0	4.6
Accession no. 2 / <i>Exemplaire no. 2</i>	0.26	8.2	9.0	28.5	9.8	2.6
Jogduar (Dist. Jorhat)						
Accession no. 3 / <i>Exemplaire no. 3</i>	1.18	8.7	6.7	47.4	0.6	1.9
Accession no. 4 / <i>Exemplaire no. 4</i>	0.27	8.9	7.3	49.8	1.5	1.7
Borahibari (Dist. Sibsagar)						
Accession no. 5 / <i>Exemplaire no. 5</i>	0.19	7.9	9.4	15.9	7.9	16.4

Sabinene is the major constituent of essential oil (28.5 to 49.8 %) of all the plants except from Borahibari containing only 15.9 %. This plant contains limonene as a major constituent (16.4 %). It has been observed that the larval and cocoon characters and filament length were found to be significantly low at higher percentage of sabinene in the oil. On the contrary, 'muga' silkworm reared on the plant collected from Borahibari produced significantly better larval weight (8.5g), cocoon weight (4.2g), ERR % (39.5), filament length (322.25 m) and non-breakable filament length (321.0 m). Negative correlation effect was also observed between sabinene percentage and yield attributing characters of muga silk (Table III). Good performance of "muga" silkworm on plant A5 may be due to low concentration of sabinene (15.9 %) and comparatively high percentage of limonene (16.4) or combined effect of these two chemicals. Effect of different essential oil constituents on the insect feeding and their action was also in agreement with present findings (Hendry *et al.*, 1975; Maxwell *et al.*, 1967; Maxwell *et al.*, 1972; Weatherston, 1970) Mejangkari silk obtained from five different plants produced excellent glossy lustrous and soft fibre having three different shades i. e.; A. Light creamy white, B. Creamy white and C. Golden creamy. It has been observed that with the increase of sabinene percentage in oil the colour of the silk also changes from light creamy to golden creamy. Thus it may be inferred that the variation of chemical constituents in essential oil change the colour of the 'muga' silk.

Future prospect:

In recent decades *B. mori* silk has flooded the market and the price of popular silk fabrics has become extremely low (Akai 2000). But *Antheraea assama* reared on "som" (*Persea bombycina*) plant producing golden silk is comparatively costly. However, traditional dress like "Mekhala-chadar" are very much fond of by the Assamese folk on the other hand "Sari" made out of "muga" silk is also attractive to the Indian women. The high priced "muga" silk produced in

northeast India is not sufficient enough to cater for the domestic requirement though there is a demand from outside consumers. Silk-loving consumers are now interested in some of the silk which are used in more unique fabrics and have a different character. In this context, it will be worth mentioning that, new silk from *Cricula trifenestrata* has been discovered and appreciated by silk-loving consumers in spite of its high price. Further, recently developed silk from *Anaphy* family is highly valued for its special soft feeling and antibacterial action (Akai, 2000).

Table II. Growth and post harvest cocoon characters of muga silk worm (*A. assama*) as affected by *Litsea cubeba* plants collected from different places of northeast India.

Tableau II. Croissance et caractères du cocon du ver à soie muga (A. assama) après la récolte en fonction de la provenance des plants de Litsea cubeba au nord est de l'Inde.

Characters <i>Caractères</i>	Places of collection of <i>Litsea cubeba</i> plants <i>Lieux de recueil des plants de Litsea cubeba</i>					
	Jorhat		Jogduar		Borahibari	
	A1	A2	A3	A4	A5	C. D. at 5 %
Average larval weight (g) <i>Poids larvaire moyen (g)</i>	6.92	7.35	5.05	5.85	8.50	0.49
Rearing duration (days) <i>Durée d'élevage (jours)</i>	30.95	30.00	28.12	29.20	27.75	0.98
Av. Cocoon weight (g)* <i>Poids moyen du cocon (g)*</i>	2.92	3.67	2.75	3.07	4.20	0.10
Shell weight (g) <i>Poids de la coque (g)</i>	0.31	0.38	0.19	0.28	0.36	0.03
Silk ratio (%) <i>Richesse soyeuse (%)</i>	10.45	8.27	7.08	9.27	8.58	0.83
ERR (%) / <i>Taux effectif d'élevage</i>	19.25	27.00	9.25	15.50	39.50	1.54
Sericin (%) / <i>Séricine (%)</i>	21.00	18.00	20.00	18.00	15.25	2.14
Fibroin (%) / <i>Fibroïne (%)</i>	79.00	82.00	80.00	82.00	84.75	3.36
Filament length (m) <i>Longueur du filament (m)</i>	247.50	287.75	139.00	224.75	322.25	6.84
Non breakable filament length (m) <i>Longueur du filament sans rupture (m)</i>	139.5	230.75	69.75	189.25	321.00	4.96

A=Accession number of *L. cubeba* / *Numéro d'exemplaire de L. cubeba*.

*= Oven dry cocoon weight / *Poids du cocon séché au four*.

Table III. Showing the correlation co-efficient values (r) between essential oil percentage and their constituents and post harvest qualities of 'muga' silkworm.

Tableau III. Présentation des valeurs du coefficient de corrélation (r) entre le pourcentage d'huiles essentielles et leurs constituants et les caractères du ver à soie "muga" après la récolte.

Post harvest characters of muga silkworm	r values
Caractères du ver à soie muga après la récolte	valeurs r
Essential oil percentage of leaf and filament length (m) <i>Pourcentage d'huile essentielle de la feuille et longueur du filament (m)</i>	-0.80**
Sabinene percentage of essential oil and larval weight (g) <i>Pourcentage de sabinene de l'huile essentielle et poids larvaire (g)</i>	-0.83**
Sabinene percentage of oil and cocoon weight (g) <i>Pourcentage de sabinene de l'huile et poids du cocon (g)</i>	-0.91**
Sabinene percentage of oil and effective rate of rearing (%) <i>Pourcentage de sabinene de l'huile et taux effectif d'élevage (%)</i>	-0.92**
Sabinene percentage of oil and filament length (m) <i>Pourcentage de sabinene de l'huile et longueur du filament (m)</i>	-0.83**
Sabinene percentage of oil and non breakable filament length (m) <i>Pourcentage de sabinene de l'huile et longueur du filament sans rupture (m)</i>	-0.75**

**Denotes 1 % level of significant / Significatif au seuil de 1 %.

Each silk fabric and its finish products carry their own special characters and some of them maintain a high market price. As the demand for special type of silk fabric is increasing, under this concept, high cost "mejankari" silk with new look and different shades may attract attention of the consumer.

It is also presumed that "muga" produced at a higher cost from *L. cubeba* may not find its market. In this respect it is pertinent to examine the case of *Antheraea yamamai* in Japan. Although in golden age (1870-1920) yamamai cocoon production to the tune of 18,000-60,000 tons per year is a thing of the past, at present about 2 tons of them are produced, from which about 100 kg of yamamai silk is obtained. The silk is used almost exclusively for fine embroidery on *Bombyx* silk fabrics because of its characteristically blue colour and special lustre after degumming. Due to limited amount of silk produced, the price of the silk is very high, about 30 to 40 times that of *Bombyx* silk. Therefore, it seems reasonable for the time being to develop it into a unique local industry for high-value added products using the characteristics of the *A. yamamai* (Kuribayashi, 1998; Akai, 2000). Considering the above fact, the unique glossy creamy with liquefacent lustre silk produced from *L. cubeba* may find its new use in embroidery in various products apart from conventional apparels at reasonably high cost or the cost may come down to greater extent with proper selection of chemotype and advanced technology.

CONCLUSION

The present investigation indicated that there is an urgent need to explore the northeast Indian germplasm for determination of various chemotypes of *L. cubeba* and to establish their relationships with the colour variations and quality of silk produced by *Antheraea assama* subsisting on this host plant species; which has so far not been reported.

ACKNOWLEDGEMENT

Author thanks Dr J. S. Sandhu, Director of the Regional Research Laboratory at Jorhat, Assam, India for providing the facilities for this work.

REFERENCES

- AHMED R. Z., CHOUDHURY S.N., BHATTACHARYYA P.R. (1998) Variation in cocoon characteristics of 'muga' silkworm (*Antheraea assama* Westwood) reared on 'som' (*Persea bombycina* Kost.), collected from different places of upper Assam, India. *Sericologia*, 38(4), 699-702.
- AKAI H., (2000) Cocoon filament characters and post cocoon technology. Proc. on the 3rd International conference on wild silkmoth. Organised jointly by International society for wild silkmoths, Japan & Central silk board, India, 5, 255-259.
- CHOUDHURY S. N., LECLERCQ P.A. (1995) Essential oil of *Machilus bombycina* King from northeast India. *J. Essent. Oil Res.*, 7, 199-201.
- CHOUDHURY S.N., GHOSH A.C., CHOUDHURY M., LECLERCQ P.A. (1997) Essential oils of *Litsea monopetala* (Roxb.) Pers. A new report from India. *J. Essent. Oil Res.*, 9, 635-639.
- CHAUDHURY S. N., (1981) Muga silk industry. Directorate of Sericulture and Weaving, Govt. of Assam, Gauhati, Assam, India, pp 1-33.
- CHOUDHURY S. N., AHMED R., BARTHEL A., LECLERCQ P.A. (1998) Composition of the stem, flower and fruit oils of *Litsea cubeba* Pers. from two locations of Assam, India, *J. Essent. Oil Res.* 10(4) 381-386.
- CHOUDHURY S. N., AHMED R., BARTHEL A., LECLERCQ P.A. (1998) Composition of essential leaf oil of *Litsea cubeba* Pers. from Assam. *Sericologia*, 38(4), 681-687.
- DUTTA L. C., KALITA M.N., SARKAR C.R. (1997) Foliar constituents of the food plants of 'muga' silkworm (*Antheraea assama* Westwood). *Indian J. Seric.* 36(1), 85-86.
- GRUNWALD C., (1975) Plant sterols, *Ann Rev. Pl. Physiol.* 26, 209.
- HENDRY L. B., WICHMANN J. K., HINDERLANG D. M., MUMMA R., ANDERSON M. E., (1975) Evidence for origin of insect sex pheromones: Presence of food plants. *Science*, 188, 59-62.
- HOOKE J. D. (1885) The flora of British India. Williams Clowes and Sons Ltd., London, England, 5, 155-180.
- KANJILAL U.N., KANJILAL P.C., DE R.N., DAS A. (2nd reprint, 1992) Flora of Assam. Periodical Expert Book Agency, Vivek Vihar, Delhi, India, 4, 46-101.
- KURIBAYASHI S. (1998) Non-mulberry sericulture in Japan; History, current status, problems and prospects. Presented in 3rd International conference on wild silkmoth, Organised jointly by International society for wild silkmoth, Japan and Central Silk Board, India, At Bhubaneswar, India, 11-14 Nov.
- MAXWELL F.G., JENKINS J.N., PARROTT W.L., (1967) Influence of constituents of the cotton plant on feeding, oviposition and development of the boll weevil. *J. Eco. Ent.* 60, 1294-1297.
- MAXWELL F.G., JENKINS J.N., PARROTT W.L. (1972) Resistance of plants to insects. *Adv. Agron.* 24, 187-265.
- NATH S.C., HAZARIKA A.K., SINGH R.S., GHOSH A.C., (1994) *Litsea cubeba* Pers. A promising source of citral from northeast India. *Indian Perfumer*, 38(1), 26-29.

- NATH S.C., HAZARIKA A.K., BARUAH A., SARMA K.K. (1996) *Litsea cubeba* Pers. -An additional chemotype of potential industrial value from northeast India. J. Essent. Oil Res. 8(5), 575-576.
- NATH S.C., HAZARIKA A.K., BORDOLOI D.N.(1988) Citral in *Litsea cubeba* Pers. from Arunachal Pradesh. Environmental awareness, 11(1-2) 19-20.
- RAGHAVIAH G., JAYARAMAIAH M.(1988) Efficacy of some essential oils as disinfectants of silk worm rearing equipment. Indian Perfumer, 32(2), 113-115.
- ROBINSON T.,(1974) Metabolism and function of alkaloids in plants. Science, 184,430-435.
- SATYAVATI G.V., GUPTA A.K., TANDON N. (1987) Medicinal Plants of India, ICMR, Publication and Information Directorate, New Delhi, India, 2, 168-169.
- WEATHERSTON J., PERCY J.E., (1970). Arthropod defensive secretions In : Chemical controlling Insect behavior Edt. by M Beroza, Academic Press, New York

NOUVEAU RAPPORT SUR L'EFFET DES HUILES ESSENTIELLES DE *LITSEA CUBEBA* PERS. SUR LA PERFORMANCE D'ELEVAGE DU VER A SOIE MUGA (*ANTHERAEA ASSAMA*) ET LA QUALITE DE SA SOIE

S. N. CHOUDHURY

Department of Plant Sciences and Ecology, Regional Research Laboratory, Jorhat — 785006,
Assam, Inde.

Litsea cubeba Pers. connu localement sous le nom de "mejankari" dans l'Assam, est une plante hôte du ver à soie muga (*Antheraea assama* W/w). Cette plante produit une soie de type spécial appelée "mejankari pat" que l'on trouve seulement dans les parties du nord-est de l'Inde. Les feuilles de cette plante contiennent des huiles essentielles à différentes concentrations (0,10 à 1,18 %) dont les principaux constituants chimiques présentent aussi des concentrations extrêmement variables (sabinene de 15,9 à 49,8 %).

Il s'avère que les feuilles des plantes qui contiennent une quantité moins importante en huiles essentielles (0,1 %), de faibles pourcentages en constituants principaux tels que le sabinene (15,9 %) et le limonene (16,4 %) sont supérieures pour l'élevage du muga. Par contre, un pourcentage élevé en huile essentielle (de 0,21 à 1,18) et un pourcentage plus important de sabinene (28,5 à 49,8) dans l'huile ont un effet néfaste sur les caractères du ver à soie muga avant et après la récolte. On trouve en général que la soie produite à partir de ces plantes est fine, lustrée, crème, brillante et douce mais on a détecté des teintes différentes en fonction des différentes plantes.

INTRODUCTION

Litsea cubeba Pers., Lauraceae, est un arbre ou un buisson à feuilles persistantes, rarement à feuilles caduques, poussant spontanément à l'est de l'Himalaya, dans l'Assam et à Manipur jusqu'à une altitude de 2 700 m au-dessus du niveau de la mer (Satyavati et coll., 1987 ; Hooker, 1885 ; Kanjilal, 1992). Cet arbre est connu localement sous le nom de "mejankari" dans l'Assam et considéré comme une plante hôte secondaire du ver à soie "muga" (*Antheraea assama* W/w). La soie "muga" produite à partir de cette plante (connue familièrement sous le nom de "mejankari pat") a un caractère crème brillant unique très attirant et a un lustre qu'aucune autre soie produite ailleurs n'égale. Cette soie est beaucoup plus chère que la soie produite à partir d'autres plantes hôtes du "muga" (Choudhury, 1981).

Auparavant, les trois plantes hôtes *Persea bombycina*, *Litsea monopetala* et *Litsea cubeba* étaient utilisées pour l'élevage des vers "muga" mais avec le temps, l'élevage des vers "muga" sur *L. cubeba* a cessé en raison de plusieurs facteurs. On croit en général que le taux effectif d'élevage (% ERR) obtenu avec cette plante est très faible en raison de la mortalité des vers "muga". On pense que la mortalité des vers est due à un pourcentage élevé en huile essentielle présente dans la feuille, qui a un effet nocif sur le ver à soie (Raghavaia et Jayarammaiah, 1998). De plus, l'étude de la littérature indique que *L. cubeba* a de nombreux chémotypes et on a trouvé de nombreux chémotypes dans le

nord-est de l'Inde (Choudhury et coll., 1998 ; Choudhury et coll., 1998 ; Nath et coll., 1994, Nath et coll., 1988 ; Nath et coll., 1996).

A l'indépendance de l'Inde, après un "trou" de plus de 200 ans, les éleveurs locaux du muga n'étaient plus en mesure de localiser et d'identifier la variété spécifique ou le(s) génotype(s) de *L. cubeba* pour l'élevage, ce qui explique pourquoi la production de soie à partir de cette plante a presque disparu.

Dans cette étude, nous nous sommes efforcés de trouver une relation entre l'huile essentielle, la composition de la feuille de *L. cubeba* et l'élevage et la qualité de la soie muga sur laquelle il n'y a pas eu d'étude jusqu'à présent.

MATERIELS ET METHODES

Les plantules de *Litsea cubeba* ont été recueillies dans des zones sauvages du Jorhat (Variété no. 1 & 2), les zones du Jogduar (variété no. 3 & 4) de la région de Jorhat et la zone Borahibari (variété no. 5) de la région de Sibsagar en Assam et sont plantées en quatre répétitions en prenant en compte un plant pour chaque répétition dans le Laboratoire de Recherche Régional, à Jorhat, dans l'Assam, en Inde en mars 1996. Parallèlement, on procède à l'extraction de l'huile essentielle, à l'analyse qualitative et quantitative de ces plantes et à l'élevage des vers "muga". Une publication a déjà été faite sur l'analyse qualitative et quantitative de l'huile (Choudhury et coll., 1998) et nous présentons dans cet article les effets sur l'élevage du ver à soie "muga".

L'élevage des vers muga a été réalisé en octobre-novembre (génération "Katiya") en 1998. Chaque plante cultivée est recouverte par un filet en Nylon (3,5 × 3,5 × 4 m) sur un cadre en bambou selon la taille du filet. Pour commencer, les pontes saines sont conservées sur un plateau en bambou et 100 larves du 1^{er} âge venant d'éclore sont transférées pour chaque répétition et sont laissées jusqu'à la fin de leur période larvaire. Les caractères avant et après l'éclosion ainsi que les propriétés physiques sont déterminés en prenant 20 cocons en compte pour chaque répétition. Les pourcentages de séricine et de fibroïne de la soie sont déterminés d'après la méthode modifiée de Ahmed et coll., 1998.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les plantules de *L. cubeba* sont recueillies dans une zone microclimatique dans les régions de Jorhat et de Sibsagar de l'Assam dans un rayon de 30 km. L'huile extraite de ces plantes présente des variations importantes. Parmi les différentes variétés, on enregistre la quantité maximum d'huile dans la feuille à Jogduar A3 (1,18 %) et la quantité minimum à Borahibari A5 (0,10 %). En observant les données présentées dans le Tableau II de près, on observe qu'avec l'augmentation de la quantité d'huile essentielle dans la feuille, le poids larvaire baisse de manière significative de 8,50 à 5,05 g. Par contre, la durée larvaire augmente (27,75 à 30,95 jours) avec l'augmentation du pourcentage d'huiles dans les feuilles. Le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et le taux effectif d'élevage (ERR) s'avèrent significativement meilleurs avec des pourcentages d'huile plus faibles dans les feuilles. La longueur totale du filament et la longueur du filament sans rupture des cocons augmentent de manière significative, quand on élève les vers à soie sur des plantes contenant une faible teneur en huile essentielle. On enregistre aussi une corrélation négative entre le pourcentage d'huile essentielle de la feuille et la longueur du filament ($r = -0,80$) (Tableau III).

Persea bombycina et *Litsea monopetala* sont les deux plantes hôtes primaires du ver à soie "muga" et contiennent une huile essentielle à une très faible concentration dans les feuilles, respectivement 0,08 à 0,12 % et des traces (Choudhury et Leelereq, 1995 ; Choudhury et coll., 1997). Par comparaison à ces deux plantes hôtes primaires, la feuille de *Litsea cubeba* contient de l'huile essentielle à un taux très élevé (0,10 à 1,18 %). L'huile essentielle, considérée comme un produit chimique secondaire de la plante se présente sous la forme de substances défensives qui tendent à

rendre la plante repoussante, toxique ou inadaptée chimiquement à l'utilisation par les insectes (Grunwald, 1975 ; Robinson, 1974). Compte tenu de ce fait, la feuille de *Litsea cubeba* avec un pourcentage élevé en huiles essentielles pourrait avoir un effet nocif sur le ver à soie "muga". De plus, en ce qui concerne la valeur nutritive, la feuille de *L. cubeba* est bien supérieure à *P. bombycina* et *L. monopetala* (Dutta et coll., 1997). On peut donc en déduire que *L. cubeba* à la valeur nutritive meilleure n'est pas capable de produire un ver à soie sain et de meilleurs cocons parce qu'il y a plus d'huiles essentielles dans la feuille, bien que la qualité de la soie soit bien supérieure à celle de *P. bombycina* et de *L. monopetala*.

Le sabinene est le constituant principal de l'huile essentielle (28,5 à 49,8 %) de toutes les plantes sauf de celles de Borahibari qui en contiennent seulement 15,9 %. Ces plantes contiennent du limonene comme constituant principal (16,4 %). On a observé que les caractères de la larve et du cocon et la longueur du filament s'avèrent significativement mauvais avec un pourcentage plus élevé de sabinene dans l'huile. Par contre, le ver à soie "muga" élevé sur la plante recueillie à Borahibari a de manière significative un poids larvaire (8,5 g), un poids de cocon (4,2 g), un % ERR (39,5), une longueur de filament (322,25 m) et une longueur de filament sans rupture (321 m) plus élevés. On observe aussi une corrélation négative entre le pourcentage de sabinene et les caractères attribués au rendement de la soie du muga (Tableau III). La bonne performance du ver à soie "muga" sur la plante A5 pourrait être due à la faible concentration en sabinene (15,9 %) et au pourcentage comparativement élevé en limonene (16,4) ou à l'effet combiné de ces deux produits chimiques. L'effet et l'action des différents constituants de l'huile essentielle sur le nourrissage de l'insecte confirment ces observations (Hendry et coll., 1975 ; Maxwell et coll., 1967 ; Maxwell et coll., 1972 ; Weatherston, 1970). La soie mejankari obtenue à partir de cinq plantes différentes produit une fibre excellente, brillante, lustrée et douce ayant trois teintes différentes c'est à dire A. Blanc clair crémeux. B. Blanc crème et C. Jaune crème. On observe qu'avec l'augmentation du pourcentage en sabinene dans l'huile la couleur de la soie change aussi et passe de crème clair à jaune crème. On peut donc en déduire que la variation des constituants chimiques de l'huile essentielle a un effet sur la couleur de la soie "muga".

Perspectives futures :

Au cours des dernières décennies, la soie *B. mori* a envahi le marché et le prix des tissus de soie populaires est devenu extrêmement faible (Akai, 2000). Mais *Antheraea assama*, élevé sur la plante "som" (*Persea bombycina*) produit une soie dorée qui est comparativement chère. Cependant, la robe traditionnelle telle que la "Mekhala-chadar" suffit pour répondre aux besoins domestiques bien qu'il y ait une demande des consommateurs extérieurs. Les consommateurs qui aiment la soie sont maintenant intéressés par certaines des soies qui sont utilisées pour des tissus plus uniques et au caractère différent. Dans ce contexte, cela vaut la peine de mentionner qu'on a découvert une nouvelle soie à partir de *Cricula trifenestrata* qui est appréciée par les consommateurs malgré son prix élevé. De plus, la soie récemment développée de la famille Anaphée est hautement appréciée pour sa douceur et son action antibactérienne (Akai, 2000).

Chaque tissu de soie et ses produits finis ont leurs propres caractères spéciaux et certains conservent un prix de marché élevé. Puisque la demande en soie de type spécial augmente, dans ce contexte, la soie "mejankari" au coût élevé, à l'apparence nouvelle et aux teintes différentes pourrait attirer le consommateur.

On pense aussi que le "muga" produit à un coût plus élevé à partir de *L. cubeba* pourrait ne pas trouver son marché. A cet égard, il est pertinent d'examiner le cas d'*Antheraea yamamai* au Japon. Bien que l'âge d'or (1870-1920) de la production de cocons yamamai à raison de 18 000 – 60 000 tonnes par an soit une chose du passé, à présent on en produit environ 2 tonnes, dont on obtient environ 100 kg de soie yamamai. La soie est utilisée presque exclusivement pour la broderie fine sur des tissus de soie *Bombyx* en raison de sa couleur bleue caractéristique et de son lustre spécial après le décreusage. En raison de la quantité limitée de soie produite, le prix de la soie est très élevé, environ 30 à 40 fois celui de la soie *Bombyx*. Il semble donc raisonnable pour le moment de la transformer en

une industrie locale unique pour des produits à valeur ajoutée élevée en utilisant les caractéristiques de *A. yamamai* (Kuribayashi, 1998 ; Akai, 2000). Compte tenu de cela, la soie crème brillante au lustre miroitant et unique produite par *L. cubeba* pourrait trouver une nouvelle utilisation pour la broderie de produits variés en dehors des habillements conventionnels à un coût raisonnablement élevé ou on pourrait baisser d'avantage le coût en sélectionnant correctement le chémotype et une technologie de pointe.

CONCLUSION

L'étude actuelle indique qu'il est urgent d'explorer les germoplasmes du nord-est de l'Inde pour déterminer les différents chémotypes de *L. cubeba* et définir leurs relations avec les variations de la couleur et de la qualité de la soie produite par *Antheraea assama* nourri sur cette espèce de plante hôte, ce qui n'a pas été fait jusqu'à présent.

STUDIES ON MULTIBIVOLTINE COCOON COOKING. PART I : EFFECT OF RETTING TREATMENT IN PAN COOKING ON COLOUR DIFFUSION IN COCOON SHELL

G. HARIRAJ & T.H. SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore – 560 068, India.

Cooking process causes diffusion of water inside the cocoon through the shell layers thereby softening the sericin at the crossover points. Depending upon the temperature and duration of cooking, the diffusion of water in different layers of cocoon varies. Indian multibivoltine cocoons are presently being cooked in pan system of cooking by treating them at single temperature. Studies have been conducted to analyse the influence of temperature and duration of retting in pan system of cooking on the water diffusion in the different layers of the cocoon shell, by colouring the cooking water with dye solution. Using computer colour matching system the cocoon layers were analysed for dye absorption after unraveling the filaments in 100 meters length. It was observed that the temperature and duration of retting had significant influence on the water diffusion in different layers of the cocoon shell. It was interesting to note that outer and inner layers are stained more compared to the middle layers, which may be attributed to the faster capillary action of water inside the cocoons due to pressure difference between outside and inside the cocoon shell depending on retting temperature. Further it was observed that as the retting temperature was increased, the water diffusion increased which was observed by increased colour absorption by the layers. The study clearly indicates that, pan system of cooking does not soften the sericin uniformly in middle layers of the cocoon and hence proper cooking with varying temperature patterns is essential to achieve uniform softening of all the layers of cocoon shell, for easy unwinding of cocoon filaments from the cocoons.

Keywords: Multibivoltine cocoons, open pan cooking, water diffusion, colour absorption, Retting.

INTRODUCTION

Softening and swelling of sericin takes place during the cocoon cooking process. When cocoons are cooked at a single temperature a pressure difference is created inside the cocoon due to expansion of air. This pressure difference leads to absorption of water by the cocoon through its shell. The temperature employed in the retting process influences this water absorption. Systematic studies have been conducted in Japan on the mechanism of water penetration in the cooking process (Shimazaki *et al.* 1952, 1961, 1962 and Kinoshita *et al.* 1982). Further, the effect of single temperature treatment of cooking, on spreading of water in cocoon shell with respect to shell area of the bivoltine cocoons has been studied (Shimazaki, 1964). The Indian multi-bivoltine cocoons are cooked using a single temperature treatment whereas hot air drying of these cocoons, leads to reduced water absorption by the cocoon shell. An attempt has been made, in the present work, to study the diffusion of water into the cocoon shell layers in respect of hot air dried Indian multi-bivoltine cocoons, by colouring the cooking water with dye solution.

MATERIALS AND METHODS

Raw material:

Commercially available multi-bivoltine cocoons (PM × NB4D2 race) reared in Karnataka state in India during the month of June 1998 have been used for the study.

Drying conditions:

The cocoons were dried in Batch type hot air drier, following the temperature pattern of 130° C-120° C -110° C -100° C - 90° C for a period of 5 hours. The degree of drying achieved was 36 - 38 %.

Retting conditions:

The dried cocoons were retted in single temperature in pan system of cooking at 5 different levels i. e., 30° C, 50° C, 70° C, 90° C and 97° C at 3 different durations of 1 minute, 3 minutes and 5 minutes.

Experimental procedure:

A dye solution was prepared using an acid dye (Acidol grey SBL, Sandoz Ltd, India) having a concentration of 0.2 g/l. 300ml of the dye solution in each cooking bath and 50 cocoons were used for each test. The coloured water was heated up to the required level to cook the cocoons and 50 cocoons in a specially designed cage were dipped inside the water, to enable the coloured water to percolate into the cocoon layers. The stained cocoons were single cocoon reeled individually using an eprouvette in plain water maintained at 80°C. The floss layer was brushed and removed and samples of 100 meters silk filament reeled were collected separately. Also the pelade layers were collected separately. The samples of filament, floss and pelade layers were dried under ambient conditions before being taken for further assessment [Kinoshita (1997)].

Data analysis:

The coloured layers were then measured for colour strength using chromafash colour matching system. The colour strength in terms of K/S values of floss layer is found initially and the colour percolation difference in each 100 meters and pelade layer were measured in the visible range of 400-700 nm using the Kubelka Munk equation.

$$K/S = (1 - R * 0.01)^2 / (2 * R * 0.01)$$

Where,

K = Absorption co-efficient

S = Scattering co-efficient

R = % Reflectance

Care has been taken to expose the samples to uniform lighting level. The data thus obtained were analysed statistically using SPSS package.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The analysis of variance results of colour absorbency in various cocoon shell layers presented in Table I showed that significant difference exists among retting temperature and retting duration of Indian multi-bivoltine cocoons. The mean colour absorbency in the floss layer, silk filament layers and pelade layer of the Indian multi-bivoltine cocoons treated with different retting temperature and duration in single temperature treatment are given in Figures 1 and 2. The interaction effects between the retting temperatures and durations on colour absorption characteristics are given in Table II.

Table I. Analysis of variance result of colour absorbency of cocoon layers during retting treatment of multi-bivoltine cocoons.

Tableau I. Résultat de l'analyse de variance pour l'absorption de la couleur dans les couches des cocons poly-bivoltins pendant le traitement de rouissage.

Source	Total sum of square	Degree of freedom	Mean sum of square	F-Value
	<i>Somme totale des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Moyenne de la somme des carrés</i>	<i>Valeur F</i>
Retting temperature / <i>Température de rouissage</i>	28516.42	4	7129.1	150.0**
Retting duration / <i>Durée de rouissage</i>	5524.56	2	2762.3	58.12**
Retting temperature × Retting duration <i>Température de rouissage × durée de rouissage</i>	1806.10	8	233.3	4.91**
Error / <i>Ecart</i>	2851.58	60	47.5	
Corrected Total / <i>Total corrigé</i>	38758.66	74		

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

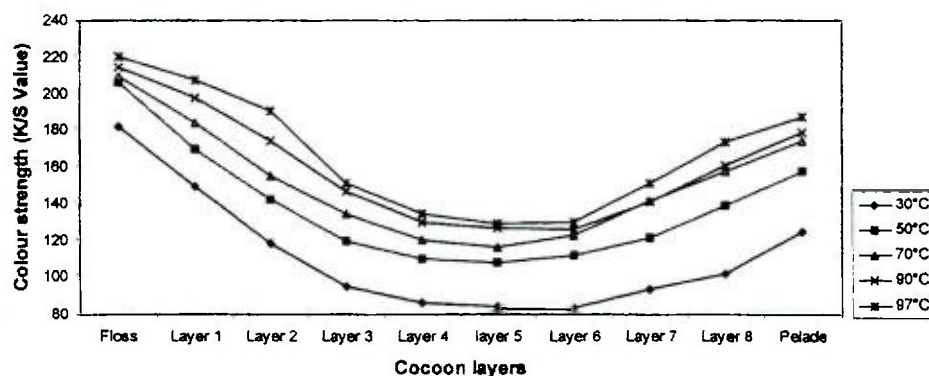


Figure 1. Effect of retting temperature on colour absorption in different layers of cocoon shell.

Figure 1. Effet de la température de rouissage sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse.

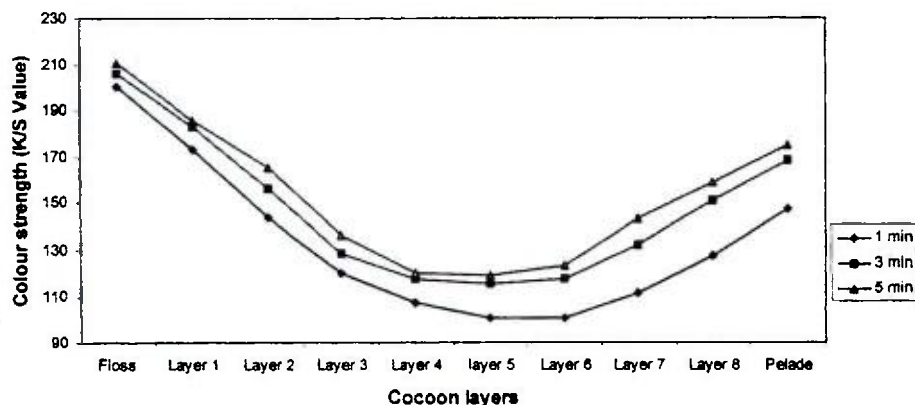


Figure 2. Effect of retting duration on colour absorption in different layers of cocoon shell.

Figure 2. Effet de la durée de rouissage sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse.

a. Analysis variance results of colour absorption characteristics after retting:

The analysis of variance results given in Table I showed that significant difference exists among retting temperatures and duration of retting on colour absorption in different layers of cocoon shell. The interaction effect between retting temperature $\times$ retting duration was found to be significant at 1 % level. The contribution factor of retting temperature and duration on colour absorbency was found to be 73.1 % and 14.0 % respectively.

b. Effect of retting temperature on colour absorbency:

From the results given in Figure 1 it could be observed that as the temperature of retting increases the colour absorbency in all the layers increases, in a curvilinear fashion. At 97° C, the colour absorbency is highest and at 30° C it is lowest, as indicated by the K/S values in respect of all the layers. This is because when the retting temperature is higher, the air inside the cocoons expands and allows it to escape through the shell layers. The pressure difference created from inside to outside of the cocoons allows the water to diffuse into the cocoon layers. Further it could be observed that all the cocoon layers show a significant difference in colour absorption except the 4th, 5th and 6th layers which do not show any significant difference in colour absorption in all the retting temperature selected for the study. This is attributed to faster penetration of water through middle layers while passing from outside to inside the cocoon shell. The 50° and 70°C did not show much difference in colour absorbency in cocoon shell layers.

c. Effect of retting duration on colour absorbency:

Colour absorbency is found to increase in all the layers of the cocoon shell, as the retting duration increased. At 1 minutes treatment colour absorbency is the lowest as seen from the K/S values. Further it was observed that there is a significant difference in colour absorbency in all the layers except between 4th, 5th and 6th layers of the cocoon shell as seen from Figure 2. This result is in line with the observations made while studying the effect of temperature.

Table II. Interaction results of colour absorbency of cocoon layers treated with different temperatures and duration of single temperature cooking of multi-bivoltine cocoons.*Tableau II. Résultats de l'interaction entre l'absorption de la couleur des couches de cocons poly-bivoltins et les différentes températures et durées de température unique de cuisson.*

Retting temperature and duration	Floss layer	Silk layer 1	Silk layer 2	Silk layer 3	Silk layer 4	Silk layer 5	Silk layer 6	Silk layer 7	Silk layer 8	Pelade layer
<i>Température et durée de rouissage</i>	<i>Couche de blaze</i>	<i>Soie couche 1</i>	<i>Soie couche 2</i>	<i>Soie couche 3</i>	<i>Soie couche 4</i>	<i>Soie couche 5</i>	<i>Soie couche 6</i>	<i>Soie couche 7</i>	<i>Soie couche 8</i>	<i>Pélete</i>
30 ° C - 1 min.	174.39 (12.78)	147.15 (21.31)	113.65 (14.52)	92.87 (9.99)	87.82 (8.24)	87.56 (11.0)	83.55 (7.97)	91.26 (9.11)	98.37 (11.45)	119.66 (9.19)
30 ° C - 3 min.	180.78 (2.73)	147.80 (16.60)	117.21 (10.45)	93.19 (4.23)	85.35 (3.74)	83.95 (7.25)	85.09 (7.12)	92.49 (4.15)	101.56 (6.75)	122.54 (3.75)
30 ° C - 5 min.	187.98 (7.79)	149.35 (12.88)	120.75 (19.40)	95.09 (8.69)	82.54 (5.23)	78.04 (3.71)	78.76 (7.94)	92.72 (9.51)	101.67 (10.48)	128.01 (15.57)
50 ° C - 1 min.	198.40 (6.44)	148.61 (2.31)	123.45 (18.33)	106.00 (11.48)	94.35 (7.57)	89.29 (4.65)	90.89 (4.45)	93.28 (7.08)	108.48 (14.49)	129.31 (14.09)
50 ° C - 3 min.	206.96 (2.58)	177.86 (3.11)	145.21 (12.83)	121.77 (10.33)	114.75 (3.82)	114.84 (5.82)	120.33 (11.96)	133.27 (12.33)	151.59 (6.77)	170.62 (4.68)
50 ° C - 5 min.	209.77 (8.46)	179.67 (12.35)	153.95 (16.27)	127.55 (18.11)	116.94 (13.32)	115.55 (9.05)	121.26 (8.31)	134.97 (11.27)	153.36 (8.49)	170.76 (10.36)
70 ° C - 1 min.	205.23 (2.41)	180.15 (10.81)	152.43 (12.44)	132.41 (7.47)	116.54 (6.29)	104.39 (11.63)	106.47 (9.54)	118.58 (13.86)	135.17 (14.65)	159.42 (11.22)
70 ° C - 3 min.	208.72 (7.72)	182.27 (7.06)	152.91 (8.72)	133.76 (9.68)	119.81 (7.41)	119.69 (10.21)	127.84 (10.96)	150.54 (5.69)	164.46 (6.22)	174.03 (10.43)
70 ° C - 5 min.	209.72 (1.03)	185.18 (10.14)	156.35 (8.93)	134.79 (6.36)	120.55 (9.91)	121.03 (8.69)	129.79 (10.94)	152.12 (7.23)	170.03 (9.96)	186.06 (8.16)
90 ° C - 1 min.	205.81 (5.32)	186.39 (10.72)	149.09 (17.31)	133.68 (16.16)	116.75 (14.17)	109.11 (13.39)	110.33 (8.45)	125.84 (3.96)	145.10 (15.10)	160.02 (11.31)
90 ° C - 3 min.	213.39 (5.66)	198.38 (6.22)	177.74 (17.30)	146.74 (17.89)	132.60 (12.23)	123.36 (14.85)	117.39 (21.48)	126.37 (23.57)	153.98 (14.26)	178.37 (5.79)
90 ° C - 5 min.	220.35 (6.92)	203.77 (6.55)	191.68 (17.67)	155.80 (11.69)	137.80 (16.16)	143.68 (14.69)	147.82 (15.14)	167.27 (19.68)	180.10 (10.01)	194.75 (5.02)
97 ° C - 1 min.	216.94 (3.41)	203.57 (4.64)	179.26 (18.18)	135.36 (9.75)	121.04 (9.99)	111.67 (10.67)	111.44 (14.27)	127.01 (5.87)	148.68 (3.31)	167.25 (2.36)
97 ° C - 3 min.	217.03 (6.27)	207.03 (3.87)	186.18 (12.09)	147.19 (9.83)	135.53 (15.44)	136.43 (23.19)	135.88 (17.20)	156.72 (11.44)	182.82 (4.94)	194.77 (4.05)
97 ° C - 5 min.	223.35 (3.79)	208.86 (8.06)	202.58 (8.51)	168.45 (9.52)	142.53 (15.11)	136.89 (16.32)	138.81 (17.19)	167.91 (4.96)	186.08 (8.28)	195.28 (5.25)

CD at 5% for retting temperature $\times$ retting duration = 8.54 / Différence critique à 5 % pour la température de rouissage $\times$ durée de rouissage = 8,54.

Values in the parenthesis are standard deviation values. / Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs de l'écart type.

d. Interaction of both retting temperature and duration on colour absorbency

The interaction effect between the colour absorbency in different layers of cocoon shell and different temperature and duration of retting treatment is given in Table II. From the Table II, it could be observed that both the mean interaction between the temperature of retting and duration of retting showed an increasing trend in different layers of the cocoon shell. Further it is seen from the Table II that when the retting temperatures are low, significantly lower colour absorbency was observed in layers 3rd to 8th. With the increase in retting temperatures 3rd, 7th and 8th layers absorb significantly more colour than the middle layers i.e., 4th to 6th layers. Thus from the results it is inferred that single temperature cooking of the cocoons does not soften the sericin in the middle layers which has led to increased dropped cocoons due to filament breakage, whereas the floss layers and pelade layers are absorbing significantly more colour compared to the middle layers.

It can also be observed from Table II that, 30° C retting temperature at 1, 3 and 5 minutes duration colour absorbency is significantly different from all other temperatures and durations. Similarly, 50° C retting treatment at 1 minute showed significantly better colour absorbance than 70° C treatment at 1 minute except floss layer. The colour absorbance between 70° C, 90° C and 97° C is not significantly different though the increased trend is observed. However between 70° C and 97° C, significant difference in colour absorbency is observed in all the retting duration treatments. This may be attributed to the loose shell structure of Indian multi-bivoltine cocoons. That is since the cocoon shell is more permeable to air; water easily penetrates inside the cocoon shell even at single temperature treatment.

Further it is inferred that when the cocoons were treated at high retting temperature of 97° C for 5 minutes, the colour absorbency in the cocoon layers is maximum. However high retting temperature and more duration lead to over softening of cocoon shell resulting in more waste generation during brushing. From the analysis of variance results it could be seen that the layers are following a quadratic equation and is significant at 1 % level. Also the temperature and duration of retting is following a linear relation, which is also significant at 1 % level.

It could also be observed that for different retting temperatures and duration, the floss layer and initial 3 layers shows higher absorbency and the middle layers 4th to 6th, shows a lowering of colour absorbency. However the innermost layers of 7th to 9th and the pelade layer shows once again higher colour absorbency. The reasons that could be attributed to this variation is that, the outer layers absorb more colours due to direct contact with the hot water during retting. The coloured water seems to diffuse inside the cocoon shell at high speed without wetting the middle layers. The permeated coloured water present inside the cavity of the cocoon wets the inner most layers and pelade layers as could be observed from better colour absorbency of inner layers compared to the middle layers. Kinoshita, (1997) has reported that Japanese bivoltine cocoons, when treated with varying retting temperatures and duration also gave similar results. Thus it could be inferred that for effective retting of the cocoons, the middle layers also should be softened to a suitable extent, which could be achieved by varying the temperature profiles in cooking. Hence proper cooking will enable the cocoons to unravel the filaments uniformly without any break thereby improving the reeling efficiency and raw silk quality.

CONCLUSION

From the above studies, it is inferred that retting in a single temperature at low temperatures would not soften the sericin, but wet the shell layers effectively in the cocoon shell. Further at very high temperatures of 90°, 97° C and more duration of 3, 5 minutes would lead to over softening of the sericin in the cocoon shell, but still the middle layers are not wetted (4th to 6th layer) to the desired level, which points out that single pan cooking followed in India, is not suitable for Indian multi-bivoltine cocoons. Hence in retting treatment, it is observed that hot air dried multi-bivoltine cocoons should be treated at 50° - 70°C temperature for 1 minute so that the shell layers are wetted

to the required extent facilitating further cooking in permeation treatments. Hence it is essential to adopt a proper cooking methodology with a temperature profile to soften all the layers of the cocoon shell uniformly to achieve better reeling performance and quality raw silk from hot air dried multi-bivoltine cocoons.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their gratitude to Mr. B.P.Nair, Assistant director (Stat), CSTRI, Bangalore for his statistical analysis of the results. The thanks are due to reeling section staff of CSTRI, for their cooperation while conducting the study.

REFERENCES

- KINOSHITA H., KUSAMA T. KOEKE R. (1982) "Studies related to cocoon pre-treatment before cooking", J.Silk.Sci.Tech.Japan, Vol.32, pp.10-13.
- KINOSHITA H. (1997) "Development of the optimum control method of cooking by the application of expert system", Bulletin of the National Institute of sericultural and entomological science, No.19, Oct., pp.13-20.
- SHIMAZAKI A., YOSHIKAWA INESAN (1952) "The influence of temperature and time in cooking treatment process", J.Silk.Sci.Tech.Japan, Vol. 2, pp.63-65.
- SHIMAZAKI A., SEKIJIMA (1961) "Study on pre-treatment of cocoon cooking I. Soaking temperature, time, volume and cocoon shell moisture percentage", J.Silk. Sci. Tech.Japan, Vol.11, pp.1-8.
- SHIMAZAKI A., YAMAMOTO A. (1962) "Study on pre-treatment of cocoon cooking II. Soaking treatment and cocoon shell permeability", J. Silk. Sci. Tech. Japan, Vol.12, pp.4-7.
- SHIMAZAKI A. (1964) "Filature technology lecture", Published by sericultural association, Tokyo, pp.89-134.

ETUDE SUR LA CUISSON DES COCONS POLY-BIVOLTINS. PREMIERE PARTIE : EFFET DU TRAITEMENT DE ROUISSAGE DANS LA CUISSON SUR LA DIFFUSION DE LA COULEUR DANS LA COQUE SOYEUSE

G. HARIRAJ & T. H. SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore – 560 068, Inde.

Le processus de cuisson entraîne la diffusion de l'eau à l'intérieur du cocon à travers les couches de la coque, ce qui ramollit la séricine aux points de passage. La diffusion de l'eau dans les différentes couches du cocon varie en fonction de la température et de la durée de cuisson. Les cocons poly-bivoltins indiens sont cuits avec un système de cuisson en bassine et traités à une température unique. Nous avons réalisé des études pour analyser l'influence de la température et de la durée du rouissage avec le système de cuisson en bassine sur la diffusion de l'eau dans les différentes couches de la coque soyeuse, en colorant l'eau de cuisson avec une solution colorée. En utilisant un système informatique de correspondance des couleurs, les couches du cocon sont analysées par rapport à l'absorption de la teinture après déroulement des filaments sur des longueurs de 100 m. On observe que la température et la durée de rouissage ont une influence significative sur la diffusion de l'eau dans différentes couches de la coque soyeuse. Il est intéressant de noter que les couches externe et interne sont plus colorées que les couches médianes, ce qui pourrait être attribué à l'action capillaire plus rapide de l'eau à l'intérieur de la coque en raison de la différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur de la coque soyeuse en fonction de la température de rouissage. Alors que la température de rouissage augmente, la diffusion de l'eau augmente comme le montre l'augmentation de l'absorption de la couleur dans les couches. L'étude indique clairement que le système de cuisson à la casserole ne ramollit pas la séricine de manière uniforme dans les couches médianes du cocon et il est ainsi essentiel d'avoir une cuisson adaptée avec des profils de température variés pour obtenir un ramollissement uniforme de toutes les couches de la coque soyeuse, pour un déroulement facile des filaments des cocons.

INTRODUCTION

Il se produit un ramollissement et un gonflement de la séricine pendant le processus de cuisson du cocon. Quand les cocons sont cuits à une température unique, il se crée une différence de pression à l'intérieur du cocon due à l'expansion de l'air. Cette différence de pression entraîne l'absorption de l'eau par la coque du cocon. La température employée pendant le processus de rouissage influence l'absorption de l'eau. Des études systématiques ont été menées au Japon sur le mécanisme de pénétration de l'eau pendant le processus de cuisson (Shimazaki et coll., 1952, 1961, 1962 et Kinoshita et coll., 1982). De plus, l'effet d'un traitement de température de cuisson unique sur la diffusion de l'eau dans la coque soyeuse par rapport à la surface de la coque des cocons bivoltins a été étudié (Shimazaki, 1964). Les cocons poly-bivoltins indiens sont cuits en utilisant un traitement à température unique alors que le séchage préalable à l'air chaud de ces cocons entraîne une réduction de l'absorption de l'eau par la coque soyeuse. Dans cette étude, nous avons essayé d'étudier la diffusion de l'eau dans les couches de la coque soyeuse chez les cocons poly-bivoltins indiens séchés à l'air chaud, en teintant l'eau de cuisson avec un colorant.

MATERIELS ET METHODES

Matériau brut :

Des cocons poly-bivoltins disponibles commercialement (race PM × NB4D2) élevés dans l'état du Karnataka en Inde pendant le mois de juin 1998 ont été utilisés pour l'étude.

Conditions de séchage :

Les cocons sont séchés dans un séchoir à air chaud par lots, en suivant un programme de température de 130° C - 120° C - 110° C - 100° C - 90° C pendant une période de 5 heures. Le degré de séchage atteint est de 36 à 38 %.

Conditions de rouissage :

Les cocons séchés sont rouis à une température unique dans un système de cuisson à la casserole avec 5 niveaux différents, c'est à dire 30° C, 50° C, 70° C, 90° C et 97° C et 3 durées différentes de 1 minute, 3 minutes et 5 minutes.

Procédure expérimentale :

Une solution teintée est préparée en utilisant un colorant acide (Acidol grey SBL, Sandoz Ltd, Inde) à une concentration de 0,2 g/l. 300 ml de solution colorée sont utilisés dans chaque bain de cuisson pour 50 cocons. L'eau colorée est chauffée au niveau nécessaire pour cuire les cocons et les 50 cocons placés dans une cage conçue spécialement sont plongés dans l'eau, pour permettre à l'eau colorée de passer par les couches du cocon. Les cocons colorés sont dévidés individuellement en utilisant une éprouvette dans de l'eau maintenue à 80° C. On purge et on enlève la couche de blaze et on recueille séparément des échantillons de filament de soie de 100 m. La pélette est aussi recueillie séparément. Les échantillons de filament, de blaze et de pélette sont séchés dans des conditions ambiantes avant d'être évalués plus en détail (Kinoshita, 1997).

Analyse des données :

Les couches colorées sont ensuite mesurées pour la force de la couleur en utilisant un système chromaflash de correspondance des couleurs. On mesure au début la force de la couleur exprimée en K/S de la couche de blaze puis la différence de percolation de la couleur tous les 100 mètres et enfin la pélette dans une fourchette de lumière visible de 400-700 nm en utilisant l'équation de Kubelka Munk :

$$K/S = (1 - R * 0.01)^2 / (2 * R * 0.01)$$

Où

K = Coefficient d'absorption

S = Coefficient de diffusion

R = % de réflexion

On a pris soin d'exposer les échantillons à un niveau de lumière uniforme. Les données ainsi obtenues sont analysées de manière statistique en utilisant le système SPSS.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'analyse de variance pour l'absorption de la couleur dans diverses couches de la coque soyeuse présentés dans le Tableau I montrent qu'il existe une différence significative entre les températures de rouissage et les durées de rouissage chez les cocons poly-bivoltins indiens. L'absorption moyenne de la couleur dans la couche de blaze, les couches du filament de soie et la pélette des cocons poly-bivoltins indiens traités à différentes températures et durées de rouissage est

présentée dans les figures 1 et 2. Les effets de l'interaction entre les températures et les durées de rouissage sur les caractéristiques d'absorption de la couleur sont présentés dans le Tableau II.

a. Résultats de l'analyse de variance sur les caractéristiques d'absorption de la couleur après le rouissage :

Les résultats de l'analyse de variance présentés dans le Tableau I montrent qu'il existe une différence significative entre les températures de rouissage et entre les durées de rouissage sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse. L'effet de l'interaction entre la température de rouissage et la durée de cuisson s'avère significatif au seuil de 1 %. Le facteur de contribution de la température et de la durée de rouissage sur l'absorption de la couleur est respectivement de 73,1 % et 14 %.

b. Effet de la température de rouissage sur l'absorption de la couleur :

D'après les résultats présentés sur la figure 1, on peut observer qu'alors que la température de rouissage augmente, l'absorption de la couleur dans toutes les couches augmente de manière parabolique. A 97° C, l'absorption de la couleur est la plus élevée et à 30° C, elle est la plus faible, comme l'indiquent les valeurs K/S pour toutes les couches. Lorsque la température de rouissage est plus élevée, l'air à l'intérieur des cocons augmente, ce qui lui permet de s'échapper à travers les couches du cocon. De plus, on a pu observer que toutes les couches du cocon présentent une différence significative d'absorption de la couleur sauf les 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} couches qui ne présentent pas de différence significative d'absorption de la couleur pour toutes les températures de rouissage sélectionnées pour l'étude. On attribue cela à la pénétration plus rapide de l'eau au travers des couches médianes pendant qu'elle passe de l'extérieur à l'intérieur du cocon. Les températures de 50° et 70° C ne donnent pas de différence importante d'absorption de la couleur dans les couches de la coque soyeuse.

c. Effet de la durée de rouissage sur l'absorption de la couleur :

L'absorption de la couleur augmente dans toutes les couches de la coque soyeuse lorsque la durée de rouissage augmente. Avec un traitement d'une minute, l'absorption de la couleur est la plus faible comme le montrent les valeurs K/S. De plus, on observe qu'il y a une différence significative d'absorption de la couleur dans toutes les couches sauf pour les 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} couches de la coque soyeuse comme l'indique la Figure 2. Ce résultat confirme les observations relatives à l'étude de l'effet de la température.

d. Interaction entre la température et la durée de rouissage sur l'absorption de la couleur :

L'effet de l'interaction entre l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse et différentes températures et durées de rouissage est présenté dans le Tableau II. D'après le Tableau II, on peut observer que l'interaction moyenne entre la température de rouissage et la durée de rouissage présente une tendance à l'augmentation dans différentes couches de la coque soyeuse. De plus, quand les températures de rouissage sont faibles, on observe une absorption de la couleur significativement plus faible de la 3^{ème} à la 8^{ème} couche. Avec l'augmentation des températures de rouissage, la 3^{ème}, la 7^{ème} et la 8^{ème} couches absorbent significativement plus de couleur que les couches médianes, c'est à dire de la 4^{ème} à la 6^{ème} couche. Ainsi, d'après ces résultats on peut déduire que la température unique de cuisson des cocons ne ramollit pas la séricine dans les couches médianes ce qui conduit à une augmentation des ruptures du filament, tandis que les couches de blaze et la pélette absorbent significativement plus de couleur par comparaison aux couches médianes.

On peut aussi observer d'après le Tableau II qu'avec une température de rouissage de 30° C pendant une durée de 1, 3 et 5 minutes, l'absorption de la couleur est significativement différente par rapport à toutes les autres températures et durées. De même, un traitement de rouissage à 50° C pendant 1 minute donne une meilleure absorption de la couleur qu'avec un traitement à 70° C pendant

une minute sauf pour la couche de blaze. L'absorption de la couleur entre 70° C, 90° C et 97° C n'est pas significativement différente bien qu'on observe une tendance à l'augmentation. Cependant, entre 70° C et 97° C, on observe une différence significative d'absorption de la couleur pour toutes les durées de rouissage. Cela peut être attribué à la structure relâchée de la coque des cocons poly-bivoltins indiens. Comme la coque soyeuse est plus perméable à l'air, l'eau pénètre facilement à l'intérieur de la coque soyeuse même avec un traitement à température unique.

Quand les cocons sont traités à une température de rouissage élevée de 97° C pendant 5 minutes, l'absorption de la couleur dans les couches du cocon est maximum. Cependant, une température de rouissage élevée et une durée plus longue entraînent un trop grand ramollissement de la coque soyeuse qui donne plus de déchets pendant le battage. D'après les résultats de l'analyse de variance, on peut voir que les couches suivent une équation quadratique qui est significative à un seuil de 1%. La température et la durée de rouissage suivent une relation linéaire, qui est également significative au seuil de 1%.

On peut aussi observer que pour les différentes températures et durées de rouissage, la couche de blaze et les 3 couches initiales présentent une absorption plus élevée que les couches médianes 4 à 6. Cependant, les couches les plus internes 7 à 9 et la pélette présentent encore une fois une absorption plus importante de la couleur. Les raisons de cette variation pourraient être liées au fait que les couches externes absorbent plus de couleur en raison du contact direct avec l'eau chaude pendant le rouissage. L'eau colorée semble se diffuser à l'intérieur de la coque soyeuse à une vitesse élevée sans mouiller les couches médianes. L'eau colorée imprégnée présente à l'intérieur de la cavité du cocon mouille les couches les plus internes et la pélette comme le montre la meilleure absorption de la couleur des couches internes par comparaison aux couches médianes. Kinoshita (1997) a rapporté que les cocons bivoltins japonais, quand on les traite avec des températures et durée de rouissage variées donnent des résultats similaires. Ainsi, on pourrait en déduire que pour un rouissage efficace, les couches médianes devraient aussi être ramollies à un degré convenable, que l'on peut obtenir en variant les profils de température pendant la cuisson. Ainsi, une cuisson adaptée des cocons permettra de dérouler les filaments de manière uniforme sans aucune rupture, ce qui améliorera l'efficacité de dévidage et la qualité de la soie grège.

CONCLUSION

Cette étude montre que le rouissage à température unique à des températures basses ne ramollit pas la sérécine mais mouille les couches de la coque efficacement dans la coque soyeuse. De plus, à des températures très élevées de 90°, 97° et plus et des durées de 3 et 5 minutes on obtient un trop grand ramollissement de la sérécine de la coque soyeuse mais les couches médianes ne sont toujours pas mouillées (4^{ème} à 6^{ème} couche) au niveau désiré, ce qui laisse penser que la cuisson à la casserole adoptée en Inde n'est pas adaptée aux cocons poly-bivoltins indiens. Ainsi, avec le traitement de rouissage, on observe que les cocons poly-bivoltins séchés à l'air chaud devraient être traités à une température de 50° -70° C pendant 1 minute de manière à ce que les couches de la coque soient mouillées au niveau désiré ce qui faciliterait la cuisson ultérieure pendant les traitements de perméation. Il est donc essentiel d'adopter une méthodologie de cuisson adaptée avec un profil de température pour ramollir toutes les couches de la coque soyeuse de manière uniforme et atteindre de meilleures performance de dévidage et de qualité de soie grège avec les cocons poly-bivoltins séchés à l'air chaud.

STUDIES ON MULTIBIVOLTINE COCOON COOKING. PART II: EFFECT OF RETTING AND PERMEATION TREATMENTS IN PAN COOKING ON COLOUR DIFFUSION IN COCOON SHELL

G.HARIRAJ & T.H.SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore – 560 068, India.

Diffusion of water inside the cocoon through the shell layers takes place during the treatment of temperatures in cooking process thereby softening the sericin at the crossover points. Depending upon the temperature and duration of cooking, the diffusion of water in different layers of cocoon varies. Studies have been conducted for Indian multi-bivoltine cocoons to analyse the influence of temperature and duration of retting and permeation in pan system of cooking on the water diffusion in the different layers of the cocoon shell, by colouring the cooking water with dye solution. Using computer colour matching system the cocoon layers were analysed for dye absorption after unraveling the filaments in 100 meters length. It was observed that the temperature and duration of permeation had significant influence on the water diffusion in different layers of the cocoon shell. It was interesting to note that three temperatures treatment i.e., retting, high permeation temperature and low permeation temperature had significantly improved the staining of the middle layers compared to the single temperature treatment i.e., retting alone. This may be attributed to the effective capillary action of water from outside to inside the cocoons due to pressure difference created by varying temperature treatment during retting and permeation processes. Further it was observed that the permeation treatments significantly influence the water diffusion in different layers of cocoon shell, which was observed by increased colour absorption by the layers. The study clearly indicates that, pan system of cooking using three temperature treatment soften the sericin more uniformly in different layers of the cocoon shell compared to single temperature treatment, thus facilitating better unwinding of cocoon filaments from the hot air dried Indian multi-bivoltine cocoons.

Keywords: Multibivoltine cocoons, Retting, Permeation, Pan cooking, Water diffusion, colour absorption.

INTRODUCTION

The cocoon cooking process penetrates water inside the cocoons when treated at different temperatures. Water penetration takes place due to heating of cocoons and expansion of air inside the cocoons thereby creating a pressure difference inside the cocoons. This pressure difference leads to absorption of water by the cocoon through its shell. The temperature employed in the cooking process influences this water absorption. Systematic studies have been conducted in Japan on the mechanism of water penetration in the cooking process (Shimazaki *et al.*, 1952, 1961 and 1962, Kinoshita *et al.*, 1982). Further, the effect of single temperature treatment of cooking, on spreading of water in cocoon shell with respect to shell area of the bivoltine cocoons has been studied (Shimazaki, 1964). The Indian multi-bivoltine cocoons are cooked using a single temperature treatment whereas hot air drying of these cocoons, leads to reduced water absorption by the cocoon shell. An attempt has been made, in the present work, to study the diffusion of water into the cocoon shell layers in respect of hot air dried Indian multi-bivoltine cocoons, by colouring the cooking water with dye solution.

MATERIALS AND METHODS

Raw material:

Commercially available multi-bivoltine cocoons (PM × NB4D2 race) reared in Karnataka state in India during the month of June 1998 have been used for the study.

Drying conditions:

The cocoons were dried in Batch type hot air drier, following the temperature pattern of 130° C-120° C -110° C -100° C - 90° C for a period of 5 hours. The degree of drying achieved was 36 - 38 %.

Retting conditions:

The dried cocoons were taken in a cage and then retted at 50° C for 1 minute in first pan of cooking.

Permeation conditions:

The retted cocoons were immediately treated at high permeation temperature of 80° C, 90° C and 97° C for 1 minute and 2 minutes duration in second pan of cooking followed by treatment at low permeation temperature of 60° C, 70° C and 80° C for 1 minute duration in third pan of pan system of cooking.

Experimental procedure:

A dye solution was prepared using an acid dye (Acidol grey SBL, Sandoz Ltd, India) having a concentration of 0.2 g/l. 300ml of the dye solution in each cooking bath and 50 cocoons were used for each test. The coloured water was heated up to the required level to cook the cocoons and 50 cocoons in a specially designed cage were dipped inside the water, to enable the coloured water to percolate into the cocoon layers. The stained cocoons were single cocoon reeled individually using an epprouvette in plain water maintained at 80°C. The floss layer was brushed and removed and samples of 100 meters silk filament reeled were collected separately. Also the pelade layers were collected separately. The samples of filament, floss and pelade layers were dried under ambient conditions before being taken for further assessment [Kinoshita (1997)].

Data analysis:

The coloured layers were then measured for colour strength using chromafash colour matching system. The colour strength in terms of K/S values of floss layer is found initially and the colour percolation difference in each 100 meters and pelade layer were measured in the visible range of 400-700 nm using the Kubelka Munk equation.

$$K/S = (1 - R * 0.01)^2 / (2 * R * 0.01)$$

Where,

K = Absorption co-efficient

S = Scattering co-efficient

R = % Reflectance

Care has been taken to expose the samples to uniform lighting level. The data thus obtained were analysed statistically using SPSS package.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The analysis of variance results of various cocoon shell layers presented in Table I showed that significant difference exists among permeation temperatures and duration and cocoon layers of Indian

multi-bivoltine cocoons. The mean colour absorbency in the floss layer, silk filament layers and pelade layer of the Indian multi-bivoltine cocoons treated with different high permeation temperature, low permeation temperature and high permeation duration in three temperature treatment are given in Figures 1 to 3. The interaction effects between the permeation temperatures and durations on colour absorption characteristics are given in Table II.

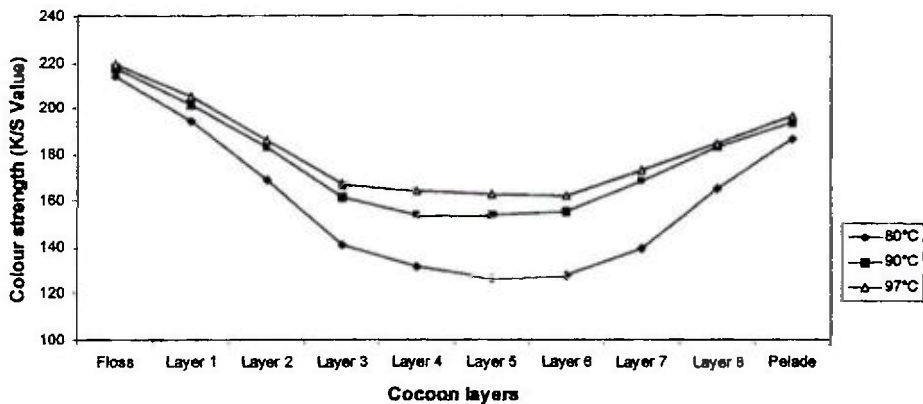


Figure 1. Effect of high permeation temperature on colour absorption in different layers of cocoon shell.

Figure 1. Effet d'une température d'imprégnation élevée sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse.

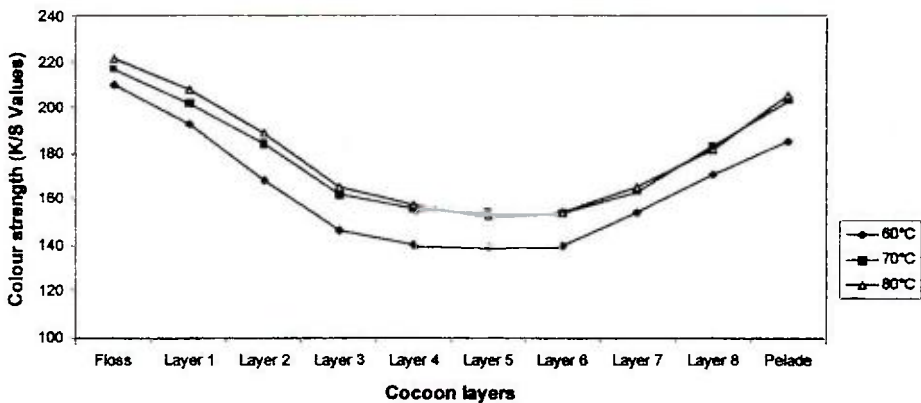


Figure 2. Effect of low permeation temperatures on colour absorption in different layers of cocoon shell.

Figure 2. Effet de faibles températures d'imprégnation sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse.

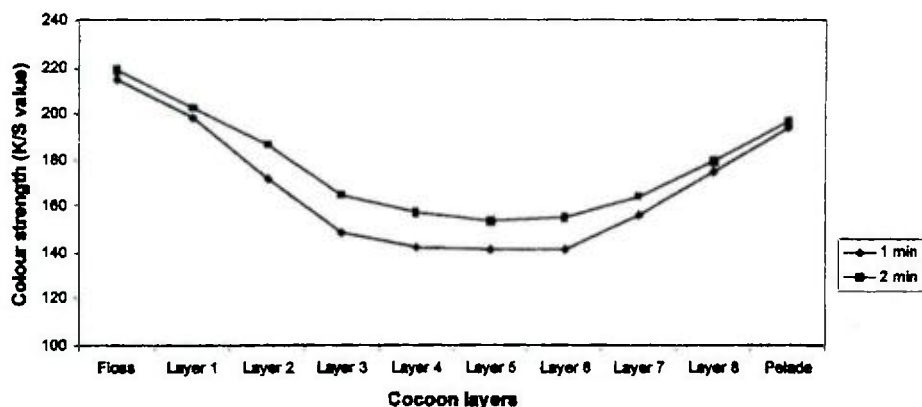


Figure 3. Effect of high permeation duration on colour absorbption in different layers of cocoon shell.

Figure 3. Effet d'une longue durée d'imprégnation sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse.

a. Analysis variance results of colour absorption characteristics after permeation:

The analysis of variance results given in Table I showed that significant difference exists among high permeation temperature, low permeation temperature and high permeation duration on colour absorption in different layers of cocoon shell at 1% level. From the cross correlation effect, it could be observed that the interaction between high permeation temperature × high permeation duration and high permeation duration × low permeation temperature have significant effect at 1% level on colour absorbency whereas the high permeation temperature × low permeation temperature has significant effect at 5% level on colour absorbency. The three way cross correlation between high permeation temperatures × low permeation temperatures × high permeation duration shown significant relation with colour absorbency at 1% level.

The contribution factor of high permeation temperature, low permeation temperature and high permeation duration on colour absorbency was found to be 43.3%, 9.13% and 3.37% respectively.

b. Effect of high permeation temperature on colour absorbency:

The results given in Figure 1 revealed that as the temperature of permeation increases the colour absorbency in all the layers increases, in a curvilinear fashion. The high permeation temperature treatment shows that the colour absorbency is highest at 97°C and at 80°C it is lowest, as indicated by the K/S values in respect of all the layers. Though the colour absorbency is on the higher side at 97°C, over softening take place at boiling temperature due to water agitation. Compared to retting studies, the colour absorbency is increased in all the layers clearly predicting that the water permeation is improved in three-temperature treatment, thus softening the sericin layers effectively. Further it could be observed that the 3rd, 4th, 5th, 6th and 7th layers do not show any significant difference in colour absorption in all the permeation temperature selected for the study. This is attributed to faster penetration of water through middle layers while passing from outside to inside the cocoon shell. This is because higher is the high permeation temperature, the more the air inside the cocoons expands and allows it to escape through the shell layers. The pressure difference created from inside to outside of the cocoons allows the water to diffuse into the cocoon layers.

Table I. Analysis of variance result of colour absorbency of cocoon layers treated at different permeation temperatures and duration of cooking of multi-bivoltine cocoons.*Tableau I. Résultat de l'analyse de variance pour l'absorption de la couleur dans les couches de cocons poly-bivoltins traités avec différentes températures d'imprégnation et durée de cuisson.*

Source	Total sum of square	Degree of freedom	Mean sum of square	F-Value
	<i>Somme totale des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Moyenne de la somme des carrés</i>	<i>Valeur F</i>
High permeation temperature <i>Température d'imprégnation élevée</i>	11423.27	2	5711.64	107.42**
Low permeation temperature <i>Faible température d'imprégnation</i>	2492.16	2	1246.08	23.43**
High permeation duration <i>Longue durée d'imprégnation</i>	932.28	1	932.28	17.53**
High permeation temperature × High permeation duration <i>Température d'imprégnation élevée × longue durée d'imprégnation</i>	976.39	2	488.19	9.18**
High permeation temperature × Low permeation temperature <i>Température d'imprégnation élevée × faible température d'imprégnation</i>	545.34	2	272.67	5.13*
High permeation duration × Low permeation temperature <i>Longue durée d'imprégnation × faible température d'imprégnation</i>	1998.19	4	499.55	9.39**
High permeation temperature × High permeation duration × Low permeation temperature <i>Température d'imprégnation élevée × longue durée d'imprégnation × faible température d'imprégnation</i>	3923.27	4	980.82	18.45**
Error / <i>Ecart</i>	3828.48	72	53.17	
Corrected Total / <i>Total corrigé</i>	26119.39		89	

** - Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.** - Significant at 5 % level. / *Significatif au seuil de 5 %.*

Table II. Interaction results of colour absorbency of cocoon layers treated with different permeation temperatures and duration of cooking of multi-bivoltine cocoons.*Tableau II. Résultats de l'interaction entre l'absorption de la couleur par les couches des cocons poly-bivoltins et les différentes températures d'imprégnation et durées de cuisson.*

Permeation Conditions	Floss layer	Silk layer 1	Silk layer 2	Silk layer 3	Silk layer 4	Silk layer 5	Silk layer 6	Silk layer 7	Silk layer 8	Pelade layer
Conditions d'imprégnation	Couche de blaze	Soie couche 1	Soie couche 2	Soie couche 3	Soie couche 4	Soie couche 5	Soie couche 6	Soie couche 7	Soie couche 8	Pélette
80°C- 60°C - 1min.	249.95 (10.08)	196.19 (16.76)	157.39 (28.92)	126.48 (24.24)	114.06 (18.83)	104.06 (6.07)	106.81 (23.75)	120.59 (34.72)	134.52 (26.22)	178.26 (23.43)
80°C- 70°C - 1min	200.24 (14.45)	189.03 (13.92)	169.21 (17.62)	143.88 (16.04)	133.11 (15.97)	128.37 (16.89)	123.54 (14.43)	130.41 (7.60)	166.62 (20.19)	187.38 (27.45)
80°C- 80°C - 1min.	200.69 (7.91)	183.42 (9.72)	153.64 (9.99)	121.32 (12.91)	112.32 (13.44)	112.94 (12.59)	110.45 (10.98)	127.72 (18.21)	154.47 (26.52)	180.63 (2.29)
80°C- 60°C - 2min.	215.86 (10.93)	201.79 (11.40)	187.88 (22.19)	166.76 (9.25)	152.82 (4.52)	154.89 (7.37)	155.87 (6.16)	165.08 (16.58)	171.95 (9.65)	172.04 (11.38)
80°C- 70°C - 2min.	216.80 (9.46)	193.67 (12.93)	174.48 (15.09)	156.04 (12.89)	150.49 (16.88)	148.49 (9.89)	145.52 (7.00)	154.53 (9.60)	175.08 (10.48)	186.77 (10.99)
80°C- 80°C - 2min	218.76 (12.62)	190.61 (12.13)	154.26 (16.69)	114.14 (8.03)	101.19 (8.92)	96.18 (11.19)	110.11 (15.14)	128.31 (28.08)	159.79 (15.32)	182.63 (11.54)
90°C- 60°C - 1min	229.68 (5.64)	209.93 (13.87)	189.27 (22.43)	156.61 (17.67)	144.45 (11.73)	142.62 (14.17)	149.80 (23.63)	170.98 (23.34)	197.85 (19.72)	196.48 (15.55)
90°C- 70°C - 1min	222.27 (10.50)	202.63 (6.08)	168.38 (9.05)	151.41 (10.44)	149.59 (9.99)	152.12 (13.05)	158.49 (13.43)	181.07 (24.39)	190.74 (20.60)	201.65 (18.59)
90°C- 80°C - 1min.	194.86 (15.59)	187.76 (8.75)	167.03 (11.78)	152.70 (10.27)	142.58 (16.05)	140.25 (17.29)	139.73 (14.09)	154.58 (18.03)	165.48 (10.66)	184.13 (9.97)
90°C- 60°C - 2min.	202.10 (6.72)	193.17 (9.27)	164.55 (15.39)	129.54 (17.30)	119.09 (13.67)	115.34 (8.66)	122.20 (16.15)	149.67 (29.09)	174.99 (3.89)	192.04 (12.38)
90°C- 70°C - 2min.	207.58 (8.43)	204.73 (3.37)	199.16 (6.39)	168.32 (9.24)	156.73 (11.34)	157.98 (7.04)	157.06 (10.10)	160.09 (7.67)	180.28 (6.00)	200.85 (10.99)
90°C- 80°C - 2min.	224.92 (7.92)	199.13 (8.68)	179.42 (12.43)	166.42 (16.37)	163.08 (16.69)	164.02 (17.07)	162.11 (15.24)	174.38 (19.95)	181.81 (23.13)	197.38 (22.45)
97°C- 60°C - 1min.	229.36 (16.95)	217.26 (7.34)	183.84 (19.03)	171.22 (17.01)	175.64 (12.84)	174.72 (12.76)	172.18 (6.95)	189.37 (4.63)	203.93 (14.83)	225.87 (15.15)
97°C- 70°C - 1min.	229.36 (9.40)	208.09 (17.91)	189.54 (21.45)	160.30 (4.37)	158.74 (7.29)	160.55 (3.56)	162.48 (6.43)	170.58 (10.20)	184.40 (13.40)	205.99 (17.52)
97°C- 80°C - 1 min.	199.08 (6.63)	188.18 (16.35)	167.41 (12.92)	150.14 (11.25)	144.87 (10.04)	148.84 (14.49)	145.41 (12.68)	156.52 (8.30)	174.87 (14.05)	189.13 (10.54)
97°C- 60°C - 2 min.	225.77 (5.24)	207.67 (5.17)	201.83 (6.98)	182.82 (17.50)	171.31 (17.59)	165.31 (9.76)	165.88 (16.68)	177.77 (12.65)	187.28 (10.03)	206.25 (10.24)
97°C- 70°C - 2min	220.29 (7.64)	209.08 (5.18)	200.51 (4.14)	186.43 (9.29)	177.88 (8.79)	167.59 (7.18)	169.89 (9.48)	176.15 (9.88)	184.88 (12.26)	186.77 (11.05)
97°C- 80°C = 2 min.	217.78 (6.46)	204.91 (6.29)	183.44 (6.13)	168.03 (3.90)	173.03 (6.41)	167.15 (5.01)	164.37 (9.74)	177.65 (18.39)	184.02 (5.91)	200.20 (9.58)

CD at 5% for high permeation temperature × low permeation temperature × high permeation duration = 9.04 / DC à 5 % pour la température d'imprégnation élevée × faible température d'imprégnation × durée d'imprégnation élevée = 9,04. Values in the parenthesis are standard deviation values. / Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs de l'écart type.

c. Effect of low permeation temperature on colour absorbency:

In the results given in Figure 2, it is revealed that the low permeation temperature treatment shows that the colour absorbency is highest at 60° C and at 80° C it is lowest, as indicated by the K/S values in respect of all the layers. The colour absorbency is on the higher side at 60° C, because of pressure difference between high permeation temperature and low permeation temperature. Further it could be observed that the 3rd, 4th, 5th, 6th and 7th layers do not show any significant difference in colour absorption in all the permeation temperature selected for the study, though the values are much higher than the single temperature treatment i.e. retting. This is attributed to faster penetration of water through middle layers while passing from outside to inside the cocoon shell. This is because higher is the high permeation temperature, the more the air inside the cocoons expands and allows it to escape through the shell layers. The pressure difference created from inside to outside of the cocoons allows the water to diffuse into the cocoon layers.

d. Effect of high permeation duration on colour absorbency:

Colour absorbency is found to increase in all the layers of the cocoon shell, as the high permeation duration increased. At 1 minutes treatment, colour absorbency is the lowest as seen from the K/S values. Further it was observed that there is no significant difference in colour absorbency between the 3rd, 4th, 5th, 6th and 7th layers of the cocoon shell as seen from Figure 3, which also indicate that 2 minutes, treatment gives better absorbency in the cocoon shell layers.

e. Interaction of both permeation temperatures and duration on colour absorbency:

The interaction effect between the colour absorbency in different layers of cocoon shell and different temperature and duration of permeation treatment is given in Table II. It could be observed that both the mean interaction between the permeation temperatures and duration showed an increasing trend in different layers of the cocoon shell. The three temperature treatments has uniformly coloured the middle layers. This may be attributed to the loose shell structure of Indian multi-bivoltine cocoons. That is since the cocoon shell is more permeable to air; water easily penetrates inside the cocoon shell at three temperature treatments. The results obtained in this study confirms with those of Shimazaki (1962), who studied the variability in the permeation effect of the cocoon shell and found that in the middle layers of the cocoon shell the water absorption is less compared to outer and inner layers. In order to reduce the variability in the permeation treatment, during high and low temperature for permeation treatments water absorption should be increased (i.e. maximum water should be allowed to penetrate) which was observed. Hence the permeation treatments further improve the cooking efficiency of the Indian multi-bivoltine cocoons.

CONCLUSION

From the above studies, it is inferred that permeation treatments facilitate further softening of sericin in different layers and let the water permeate inside the cocoon shell layers. The high permeation temperature of 90° - 95°C for 2 minutes duration and low permeation temperature of 60°-70°C permeates the water effectively into the shell layers. Further at very high permeation temperature of 97° C colour absorbency is more but lead to over softening of the sericin in the cocoon shell. The retting treatment followed by permeation treatments with high and low permeation temperatures leaves more water permeate into the cocoons from outside to inside the cocoon shell. Kinoshita, (1997) has reported that Japanese bivoltine cocoons, when treated with varying permeation temperatures and duration also gave similar results. Thus it indicates that the three temperatures permeation treatments promotes the sericin softening compared to the single temperature treatment and yield better reeling performance and quality raw silk from hot air dried Indian multi-bivoltine cocoons.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their gratitude to Mr. B.P.Nair, Assistant director (Stat), CSTRI, Bangalore for his statistical analysis of the results. The thanks are due to reeling section staff of CSTRI, for their cooperation while conducting the study.

REFERENCES

- KINOSHITA.H. KUSAMA.T. KOEKE.R. (1982) "Studies related to cocoon pre-treatment before cooking", J. Silk. Sci. Tech. Japan, Vol.32, pp.10-13.
- KINOSHITA.H. (1997) "Development of the optimum control method of cooking by the application of expert system", Bulletin of the National institute of sericultural and entomological science, No.19, Oct., pp.13-20.
- SHIMAZAKI.A. YOSHIKAWA. INESAN. (1952) "The influence of temperature and time in cooking treatment process", J.Silk.Sci.Tech.Japan, Vol. 2, pp.63-65.
- SHIMAZAKI.A. SEKIJIMA. (1961) "Study on pre-treatment of cocoon cooking I. Soaking temperature, time, volume and cocoon shell moisture percentage", J. Silk Sci. Tech. Japan, Vol.11, pp.1-8.
- SHIMAZAKI.A. YAMAMOTO.A. (1962) "Study on pre-treatment of cocoon cooking II. Soaking treatment and cocoon shell permeability", J. Silk Sci. Tech. Japan, Vol.12, pp.4-7.
- SHIMAZAKI.A. (1964) "Filature technology lecture", Published by sericultural association, Tokyo, pp.89-134.

ETUDES SUR LA CUISSON DES COCONS POLYBIVOLTINS. DEUXIEME PARTIE : EFFET DES TRAITEMENTS DE ROUISSAGE ET DE PERMEATION DANS LA CUISSON EN BAC SUR LA DIFFUSION DE LA COULEUR DANS LA COQUE SOYEUSE

G. HARIRAJ & T. H SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore – 560068, Inde.

Il se produit une diffusion de l'eau à l'intérieur du cocon à travers les couches de la coque qui ramollit la sérécine aux points de passage pendant le traitement de températures du processus de cuisson. La diffusion de l'eau dans les différentes couches du cocon varie en fonction de la température et de la durée de cuisson. Nous avons réalisé des études chez les cocons indiens poly-bivoltins pour analyser l'influence de la température et de la durée de rouissage et d'imprégnation avec le système de cuisson à la casserole sur la diffusion de l'eau dans les différentes couches de la coque soyeuse, en colorant l'eau de cuisson avec une solution teintée. On analyse l'absorption de la teinture dans les couches du cocon avec un système informatisé de correspondance des couleurs après avoir déroulé les filaments par longueurs de 100 m. On observe que la température et la durée d'imprégnation ont une influence significative sur la diffusion de l'eau dans différentes couches de la coque soyeuse. Il est intéressant de noter que le traitement avec trois températures différentes, c'est à dire rouissage, température d'imprégnation élevée et température d'imprégnation basse améliore de manière significative la coloration des couches médianes par comparaison au traitement de température unique, c'est à dire le rouissage seul. Cela peut être attribué à l'action capillaire efficace de l'eau de l'extérieur à l'intérieur des cocons, due à la différence de pression créée par le traitement à températures variées pendant les processus de rouissage et d'imprégnation. De plus, on observe que les traitements d'imprégnation influencent de manière significative la diffusion de l'eau dans les différentes couches de la coque soyeuse, comme en témoigne l'augmentation de l'absorption de la couleur dans les couches. L'étude indique clairement que le système de cuisson à la casserole en utilisant un traitement à trois températures ramollit la sérécine de manière plus uniforme dans les différentes couches de la coque soyeuse que le traitement de température unique, ce qui facilite un meilleur déroulement des filaments de cocon chez les cocons poly-bivoltins indiens séchés à l'air chaud.

INTRODUCTION

Le processus de cuisson du cocon fait pénétrer l'eau à l'intérieur des cocons quand ils sont traités à différentes températures. La pénétration de l'eau a lieu grâce au réchauffement des cocons et à l'expansion de l'air à l'intérieur des cocons ce qui crée une différence de pression à l'intérieur des cocons. Cette différence de pression entraîne l'absorption de l'eau par la coque du cocon. La température employée dans le processus de cuisson influence cette absorption d'eau. Des études systématiques ont été réalisées au Japon sur le mécanisme de pénétration de l'eau pendant le processus de cuisson (Shimazaki et coll., 1952, 1961 et 1962, Kinoshita et coll., 1982). De plus, on a étudié l'effet d'une température unique de cuisson, sur la diffusion de l'eau dans la coque soyeuse par rapport à la surface de la coque des cocons bivoltins (Shimazaki, 1964). Les cocons poly-bivoltins indiens sont cuits en utilisant un traitement à température unique tandis que le séchage à l'air chaud de ces

cocons, entraîne une réduction de l'absorption d'eau par la coque soyeuse. Nous avons essayé, dans cette étude, d'étudier la diffusion de l'eau dans les couches de la coque soyeuse chez des cocons poly-bivoltins indiens séchés à l'air chaud, en colorant l'eau de cuisson avec une solution teintée.

MATERIELS ET METHODES

Matériau brut :

Des cocons poly-bivoltins disponibles commercialement (race PM × NB4D2) produits dans l'état du Karnataka en Inde pendant le mois de juin 1998 sont utilisés pour l'étude.

Conditions de séchage :

Les cocons sont séchés dans un séchoir à air chaud en lots, en suivant un programme de températures de 130° C – 120° C – 110° C – 90° C pendant une période de 5 heures. On atteint un degré de séchage de 36 à 38 %.

Conditions de rouissage :

Les cocons séchés sont mis dans une cage et sont rouis à 50° C pendant 1 minute dans la première casserole de cuisson.

Conditions d'imprégnation :

Les cocons rouis sont immédiatement traités à une température d'imprégnation élevée de 80° C, 90° C ou 97° C pendant une durée de 1 ou 2 minutes dans une deuxième casserole de cuisson, puis mis à une faible température de rouissage de 60° C, 70° C à 80° C pendant une durée d'1 minute dans le troisième bac du système de cuisson en bac.

Procédure expérimentale :

On prépare une solution teintée en utilisant une teinture acide (Acidol grey SBL, Sandoz Ltd, Inde) à une concentration de 0,2 g/l. On utilise 300 ml de solution teintée dans chaque bain de cuisson et 50 cocons pour chaque test. L'eau colorée est chauffée au niveau requis pour cuire les cocons et on plonge 50 cocons dans l'eau à l'aide d'une cage spécialement conçue, pour permettre à l'eau colorée de passer à travers les couches du cocon. Les cocons colorés sont dévidés individuellement en utilisant une éprouvette dans de l'eau maintenue à 80° C. La couche de blaze est purgée et retirée et des échantillons de filament de soie dévidé de 100 m sont recueillis séparément. La pélette est recueillie séparément. Les échantillons de filament, de blaze et de pélette sont séchés dans des conditions ambiantes avant d'être évalués plus en détail (Kinoshita, 1997).

Analyse des données :

La force de la couleur des couches colorées est mesurée en utilisant un système de correspondance des couleurs chromafash. On évalue d'abord la force de la couleur en terme de valeurs K/S de la couche de blaze et pour tous les segments de 100 mètres et la pélette dans une fenêtre de lumière visible entre 400 et 700 nm en utilisant l'équation de Kubelka Munk :

$$KS = (1 - R \cdot 0,01)^2 / (2 \cdot R \cdot 0,01)$$

Où

K = coefficient d'absorption

S = coefficient de diffusion

R = % de reflexion

Nous avons pris soin d'exposer les échantillons à un niveau de lumière uniforme. Les données ainsi obtenues sont analysées de manière statistique en utilisant un système SPSS.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'analyse de variance présentés dans le Tableau I montrent qu'il existe une différence significative entre les températures, les durées d'imprégnation et entre les couches des cocons chez les cocons poly-bivoltins indiens. Les Figures 1 à 3 montrent l'absorption moyenne de la couleur dans la blaze, les couches du filament de soie et la pélette chez les cocons poly-bivoltins indiens traités avec des températures d'imprégnation élevées, des températures d'imprégnation basses et des durées d'imprégnation élevées différentes selon le traitement à trois températures. Les effets de l'interaction entre les températures et les durées d'imprégnation sur les caractéristiques d'absorption de la couleur sont présentés dans le Tableau II.

a. Résultats de l'analyse de variance sur l'absorption de la couleur après l'imprégnation :

Les résultats de l'analyse de variance présentés dans le Tableau I montrent qu'il existe une différence significative à un seuil de 1 % entre la température d'imprégnation élevée, la température d'imprégnation basse et une longue durée d'imprégnation et l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse. L'interaction entre la température d'imprégnation élevée et la durée d'imprégnation élevée d'une part et la durée d'imprégnation élevée et la température d'imprégnation basse d'autre part est significative au seuil de 1 %. L'interaction entre la température d'imprégnation élevée et la température d'imprégnation basse est significative au seuil de 5 %. La corrélation entre les températures d'imprégnation élevée, les températures d'imprégnation faible et la durée d'imprégnation élevée présente une corrélation significative au seuil de 1 %.

Les contributions de la température d'imprégnation élevée, de la température d'imprégnation basse et de la durée d'imprégnation élevée sont respectivement de 43,3 %, 9,13 % et 3,37 %.

b. Effet d'une température d'imprégnation élevée sur l'absorption de la couleur :

Les résultats présentés sur la Figure 1 révèlent qu'alors que la température d'imprégnation augmente, l'absorption de la couleur augmente d'une manière curvilinéaire dans toutes les couches du cocon. Le traitement à température d'imprégnation élevée montre que l'absorption de la couleur est la plus élevée à 97° C et est la moins importante à 80° C, comme l'indiquent les valeurs K/S pour toutes les couches. Bien que l'absorption de la couleur soit plutôt élevée à 97° C, il se produit un trop grand ramollissement à la température d'ébullition dû à l'agitation de l'eau. Par comparaison aux études de rouissage, l'absorption de la couleur augmente dans toutes les couches ce qui montre clairement qu'il y a une amélioration de la pénétration de l'eau avec le traitement à trois températures, ce qui ramollit les couches de séricine efficacement. De plus, on peut observer que les 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} couches ne présentent pas de différence significative d'absorption de la couleur pour toutes les températures d'imprégnation sélectionnées. On attribue cela à la pénétration plus rapide de l'eau dans les couches médianes tandis qu'elle passe de l'extérieur à l'intérieur de la coque soyeuse. C'est parce que plus la température d'imprégnation est élevée, plus le volume de l'air à l'intérieur des cocons augmente ce qui lui permet de s'échapper par les couches de la coque. La différence de pression créée de l'intérieur à l'extérieur des cocons permet à l'eau de se diffuser dans les couches du cocon.

c. Effet d'une température d'imprégnation basse sur l'absorption de la couleur :

Les résultats présentés dans la Figure 2 montrent que le traitement avec une température d'imprégnation basse donne l'absorption de la couleur la plus élevée à 60° C et la plus faible à 80° C, comme l'indiquent les valeurs K/S pour toutes les couches. L'absorption de la couleur est plutôt élevée à 60° C, en raison de la différence de pression entre la température d'imprégnation élevée et la température d'imprégnation basse. De plus, on peut observer que les 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} couches ne présentent pas de différence significative pour l'absorption de la couleur à toutes les températures d'imprégnation sélectionnées, bien que les valeurs soient beaucoup plus élevées qu'avec

le traitement de température unique, c'est à dire avec le rouissage. On attribue cela à la pénétration plus rapide de l'eau dans les couches médianes quand elle passe de l'extérieur à l'intérieur de la coque soyeuse. C'est parce que plus la température d'imprégnation est élevée, plus l'air à l'intérieur des cocons augmente, ce qui lui permet de s'échapper par les couches de la coque. La différence de pression créée de l'intérieur à l'extérieur des cocons permet à l'eau de se diffuser dans les couches du cocon.

d. Effet d'une longue durée d'imprégnation sur l'absorption de la couleur :

On trouve que l'absorption de la couleur augmente dans toutes les couches de la coque soyeuse lorsque la durée d'imprégnation augmente. Avec un traitement de 1 minute, l'absorption de la couleur est la plus faible comme le montrent les valeurs K/S. De plus, on a observé qu'il n'y a pas de différence significative d'absorption de la couleur entre les 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} couches de la coque soyeuse comme le montre la Figure 3, ce qui indique aussi qu'un traitement de 2 minutes donne la meilleure absorption dans les couches de la coque soyeuse.

e. Interaction entre les températures et la durée d'imprégnation sur l'absorption de la couleur :

L'effet de l'interaction entre des températures et des durées d'imprégnation différentes dans différentes couches de la coque soyeuse est présenté dans le Tableau II. On peut observer que l'interaction moyenne entre les températures et la durée d'imprégnation présente une tendance à l'augmentation dans les différentes couches de la coque soyeuse. Les traitements avec trois températures colorent les couches médianes de manière uniforme. Cela pourrait être attribué à la structure relâchée des cocons poly-bivoltins indiens.

C'est parce que la coque soyeuse est plus perméable à l'air que l'eau pénètre facilement à l'intérieur de la coque soyeuse avec le traitement à trois températures. Les résultats obtenus dans cette étude confirment ceux de Shimazaki (1962) qui a étudié la variabilité de l'effet d'imprégnation de la coque soyeuse et a trouvé que l'absorption de l'eau est moindre dans les couches médianes de la coque soyeuse, par comparaison aux couches externe et interne. Pour réduire la variabilité du traitement d'imprégnation, il faut augmenter l'absorption de l'eau (i. e. il faudrait laisser un maximum d'eau pénétrer) en utilisant des traitements d'imprégnation avec une température élevée et faible. Ainsi les traitements d'imprégnation améliorent l'efficacité de la cuisson chez les cocons poly-bivoltins indiens.

CONCLUSION

D'après nos études, on déduit que les traitements d'imprégnation facilitent d'avantage l'amollissement de la sérécine dans les différentes couches et laissent passer l'eau à l'intérieur des coques soyeuses. La température d'imprégnation élevée de 90° - 95° C pendant une durée de 2 minutes suivie d'une température d'imprégnation faible de 60° - 70° C laisse passer l'eau efficacement dans les couches de la coque. De plus à une température d'imprégnation très élevée de 97° C, l'absorption de la couleur est plus importante mais cela entraîne un trop grand ramollissement de la sérécine dans la coque soyeuse. Le traitement de rouissage suivi par des traitements d'imprégnation avec des températures d'imprégnation élevée et basse laisse plus d'eau pénétrer dans les cocons de l'extérieur à l'intérieur de la coque soyeuse. Kinoshita (1997) a rapporté que les cocons bivoltins japonais, quand ils sont traités avec des températures et des durées d'imprégnation variées donnent aussi des résultats similaires. Cela indique donc que les traitements avec trois températures d'imprégnation des cocons poly-bivoltins indiens séchés à l'air chaud favorisent l'amollissement de la sérécine par comparaison au traitement à température unique et donnent de meilleures performances de dévidage et de qualité de soie grège.

STUDIES ON MULTIBIVOLTINE COCOON COOKING: PART III. EFFECT OF COOKING AND ADJUSTMENT TREATMENTS IN PAN COOKING ON COLOUR DIFFUSION IN COCOON SHELL

G. HARIRAJ & T.H.SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore – 560 068, India.

Sericin softening of cocoon shell layers takes place during the cooking process. The temperatures and durations used in cooking and adjustment stages effectively soften the inner layers of the cocoon shell sericin at the crossover points. Depending upon the temperature and duration of cooking, the diffusion of water in different layers of cocoon varies. Studies have been conducted for Indian multi-bivoltine cocoons to analyse the influence of temperature and duration of cooking and adjustment in pan system of cooking on the water diffusion in the different layers of the cocoon shell, by colouring the cooking water with dye solution. Using computer colour matching system the cocoon layers were analysed for dye absorption after unraveling the filaments in 100 meters length. It was observed that the temperature and duration of cooking had significant influence on the water diffusion in different layers of the cocoon shell. It was interesting to note that five temperatures treatment had significantly improved the staining of the outer, middle and inner layers compared to the staining of the middle layers during three temperatures treatment. This may be attributed to the effective capillary action of water from outside to inside the cocoons due to pressure difference created by varying temperature treatment during cooking and adjustment processes. Further it was observed that the cooking treatments significantly influence the water diffusion in different layers of cocoon shell, which was observed by increased colour absorption by the layers. The study clearly indicates that, pan system of cooking using five temperatures treatment soften the sericin more uniformly in different layers of the cocoon shell compared to single and three temperature treatment, thus facilitating better unwinding of cocoon filaments from the hot air dried Indian multi-bivoltine cocoons, resulting in better yield and quality raw silk.

Keywords: Multibivoltine cocoons, cooking, adjustment, pan cooking, sericin, water diffusion, colour absorption.

INTRODUCTION

Suitable method of unwinding the cocoon filaments from the agglutination points between sericin layers is achieved effectively using complete cocoon cooking process. The process of cooking consists of the following parts namely, retting part in which the cocoon shell are moistened with hot water, high temperature for permeation part in which air inside the cocoon is made to expand and pressure difference is created inside the cocoon, low temperature for permeation part in which the cocoons are suddenly treated at low temperature water, to make the cocoons suck water through its layers, cooking part in which water inside the cocoon is made to exit through the cocoon layers so that the inner cocoon layer sericin is softened effectively and adjustment part in which the temperature of water is gradually reduced to enable the cocoon to absorb maximum amount of water inside the cocoon. During the above operations the cocoon shell sericin is softened suitably so that the cocoon filament unwinds smoothly without any breakage in the reeling process.

In the cocoon cooking process during cooking treatment the water absorbed in pre-treatment process will be heated up and sericin will be softened / swelled. Further, cooking treatment is totally dependent on pre-treatment process. Water permeated inside the cocoon shell during the pre-treatment process has a relation with the water permeation in the cooking process. Further the amount of water permeated in the cocoon has a relation with the cocoon shell moisture content.

Based on pre-treatment conditions, water absorption, moisture content in cocoon shell, cocoon wetting and variability in wetting of the cocoon shell differs. Mori (1915), Yamamoto (1917), Nakagawa (1932), and Ogiwara (1933) studied this method of making water absorption in the cocoons during permeation treatment. The effect of pre-treatment of the cocoon shell and its water diffusion in the shell layers has been studied [Shimazaki, (1966 and 1983) and Kinoshita *et al.*, (1982)]. Katsuno (1969 and 1973) has studied the importance of pre-treatment process on water absorption and moisture content in the shell. An attempt has been made, in the present work, to study the diffusion of water into the cocoon shell layers in respect of hot air dried Indian multi-bivoltine cocoons, by colouring the cooking water with dye solution.

MATERIALS AND METHODS

Raw material:

Commercially available multi-bivoltine cocoons (PM × NB4D2 race) reared in Karnataka state in India during the month of June 1998 have been used for the study.

Drying conditions:

The cocoons were dried in Batch type hot air drier, following the temperature pattern of 130° C-120° C -110° C -100° C - 90° C for a period of 5 hours. The degree of drying achieved was 36 - 38 %.

Retting conditions:

The dried cocoons were taken in a cage and then retted at 50° C for 1 minute in first pan of cooking.

Permeation conditions:

The retted cocoons were immediately treated at high permeation temperature of 90°C for 2 minutes duration in second pan of cooking followed by treatment at low permeation temperature of 60°C for 1 minute duration in the first pan of pan system of cooking.

Cooking and adjustment conditions:

The retted and permeated cocoons were immediately treated at cooking temperature of 93°C, 95°C and 97°C for 2 minutes and 3 minutes duration in second pan of cooking followed by adjustment treatment by pouring cold water in second pan itself. After the cocoons were cooked, the cocoons were left in the same bath without any steam supply for one minute. Then a small quantity of water was added to the bath for one minute, to decrease the temperature from 93° to 90°C. The addition of water to the bath was increased gradually so that in a period of 2 minutes the temperature of water was reduced to 80°C, 70°C and 60°C. The cocoons were kept at the same temperature for one minute and then removed from the cooking bath for brushing. The total period of adjustment was thus 4 minutes and the cooking was carried in a pan system of cooking.

Experimental procedure:

A dye solution was prepared using an acid dye (Acidol grey SBL, Sandoz ltd, India) having a concentration of 0.2 g/l. 300ml of the dye solution in each cooking bath and 50 cocoons were used for each test. The coloured water was heated up to the required level to cook the cocoons and 50

cocoons in a specially designed cage were dipped inside the water, to enable the coloured water to percolate into the cocoon layers. The stained cocoons were single cocoon reeled individually using an eprouvette in plain water maintained at 80°C. The floss layer was brushed and removed and samples of 100 meters silk filament reeled were collected separately. Also the pelade layers were collected separately. The samples of filament, floss and pelade layers were dried under ambient conditions before being taken for further assessment [Kinoshita (1997)].

Data analysis:

The coloured layers were then measured for colour strength using chromafash colour matching system. The colour strength in terms of K/S values of floss layer is found initially and the colour percolation difference in each 100 meters and pelade layer were measured in the visible range of 400-700 nm using the Kubelka Munk equation.

$$K/S = (1 - R * 0.01)^2 / (2 * R * 0.01)$$

Where,

K = Absorption co-efficient

S = Scattering co-efficient

R = % Reflectance

Care has been taken to expose the samples to uniform lighting level. The data thus obtained were analysed statistically using SPSS package.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The analysis of variance results of various cocoon shell layers presented in Table I showed that significant difference exists among cooking temperatures, duration, and adjustment temperature profiles of Indian multi-bivoltine cocoons. The mean colour absorbency in the floss layer, silk filament layers and pelade layer of the Indian multi-bivoltine cocoons treated with different cooking temperature, adjustment temperature and cooking duration in five temperature treatment are given in Figure 1 to 3. The interaction effects between the cooking temperatures and durations and adjustment temperature profiles on colour absorption characteristics are given in Table II.

a. Analysis variance results of colour absorption characteristics after complete cooking:

The analysis of variance results given in Table I showed that significant difference exists among cooking temperature and cooking duration on colour absorption in different layers of cocoon shell at 1(%) level, whereas adjustment temperature profiles did not show any significant influence on colour absorbency. From the cross correlation effect, it could be observed that the interaction between cooking temperature x cooking duration, cooking temperature x adjustment temperature profiles and cooking duration x adjustment temperature profiles have a significant effect at 1% level on colour absorbency. The three way cross correlations between cooking temperature x cooking duration x adjustment temperature profiles show a significant relation with colour absorbency at 5% level. The contribution factor of cooking temperature, adjustment temperature profiles and cooking duration on colour absorbency were found to be 6.16%, 3.17% and 0.02% respectively.

b. Effect of cooking temperature on colour absorbency after cooking:

The results given in Figure 1 revealed that as the temperature of cooking increased the colour absorbency in all the layers increases, in a curvilinear fashion. The cooking temperature treatment shows that the colour absorbency is in the middle layers increased at 97°C and comparatively less at 93°C, as indicated by the K/S values in respect of all the layers. However the colour absorbency did not change between the cooking temperatures selected for the study. This may be attributed to the fact that after complete cooking of multi-bivoltine cocoons, maximum water penetrates inside the cocoons due to shell structure of the cocoons.

Table I. Analysis of variance result of colour absorbency of cocoon layers treated with different cooking temperatures, duration and adjustment using five temperature treatments for multi-bivoltine cocoons.

Tableau I. Résultat de l'analyse de variance pour l'absorption de la couleur dans les couches des cocons poly-bivoltins traités avec différentes températures, durées et ajustements de la cuisson en utilisant cinq traitements de température.

Source	Total sum of square	Degree of freedom	Mean sum of square	F-Value
	<i>Somme totale des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne de la somme des carrés</i>	<i>Valeur F</i>
Cooking temperature <i>Température de cuisson</i>	716.80	2	358.40	12.04**
Cooking duration <i>Durée de cuisson</i>	368.23	1	368.23	12.37**
Adjustment temperature profiles <i>Profil d'ajustement de la température</i>	62.14	2	31.07	1.044
Cooking temperature × Cooking duration <i>Température de cuisson × durée de cuisson</i>	1242.74	2	621.37	20.87**
Adjustment temperature profiles × Cooking duration <i>Profil d'ajustement de la température × Durée de cuisson</i>	1708.28	2	854.14	28.69**
Adjustment temperature profiles × Cooking temperature <i>Profil d'ajustement de la température × Température de cuisson</i>	3933.61	4	983.40	33.03**
Cooking temperature × Cooking duration × Adjustment temperature profiles <i>Température de cuisson × Durée de cuisson × Profil d'ajustement de la température</i>	490.86	4	122.72	4.122*
Error / <i>Ecart</i>	2143.49	72	29.77	
Corrected Total / <i>Total corrigé</i>	10666.15	89		

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

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

Table II. Interaction results of colour absorbency of cocoon layers treated with different cooking temperatures, duration and adjustment temperature profiles using five-temperature treatment of cooking for multi-bivoltine cocoons.

Tableau II. Résultats de l'interaction entre l'absorption de la couleur dans les couches de cocons poly-bivoltins et les différents traitements de températures, durées de cuisson et profils d'ajustement de la température dans le cadre d'un traitement de cuisson à cinq températures.

Permeation conditions	Floss layer	Silk layer 1	Silk layer 2	Silk layer 3	Silk layer 4	Silk layer 5	Silk layer 6	Silk layer 7	Silk layer 8	Pelade layer
Conditions d'imprégnation	Couche de blaze	Couche de soie 1	Couche de soie 2	Couche de soie 3	Couche de soie 4	Couche de soie 5	Couche de soie 6	Couche de soie 7	Couche de soie 8	Pélette
93°C- 2 min.	231.42	218.92	209.83	171.76	157.53	162.84	163.60	188.41	206.58	189.93
- 93-60°C	(3.94)	(7.73)	(8.50)	(6.07)	(8.03)	(9.78)	(10.27)	(15.71)	(11.92)	(27.91)
93°C- 2 min.	222.56	214.04	206.38	196.98	185.67	182.77	174.14	202.32	205.77	198.47
- 93-70°C	(8.74)	(8.07)	(12.84)	(4.44)	(8.04)	(10.62)	(4.29)	(12.20)	(11.70)	(17.43)
93°C- 2 min.	232.72	223.46	219.64	199.77	189.69	179.01	171.47	186.83	187.58	199.43
- 93-80°C	(7.77)	(9.76)	(7.48)	(8.33)	(5.24)	(14.54)	(11.16)	(21.27)	(14.45)	(23.28)
93°C- 3 min.	214.54	206.34	173.55	145.80	125.70	125.50	132.61	160.87	168.39	160.92
- 93-60°C	(5.40)	(11.79)	(15.36)	(14.57)	(8.57)	(5.74)	(18.99)	(29.66)	(9.98)	(34.65)
93°C- 3 min.	224.54	215.41	201.16	197.81	190.30	192.75	183.10	187.05	199.20	199.04
- 93-70°C	(5.06)	(6.68)	(9.72)	(8.49)	(5.52)	(6.37)	(9.04)	(6.45)	(6.45)	(14.41)
93°C- 3 min.	213.86	204.34	187.62	177.35	173.95	165.36	166.64	174.78	190.79	183.36
- 93-80°C	(4.70)	(6.70)	(4.74)	(5.04)	(4.36)	(12.42)	(17.21)	(9.51)	(3.09)	(18.33)
95°C- 2 min.	225.39	216.14	208.13	195.05	187.33	185.82	177.18	188.67	193.15	198.99
- 93-60°C	(5.56)	(3.35)	(20.17)	(22.54)	(15.44)	(11.49)	(16.06)	(9.65)	(15.81)	(20.28)
95°C- 2 min.	235.67	220.83	193.93	165.73	145.90	143.67	150.04	183.79	203.66	182.10
- 93-70°C	(14.02)	(9.80)	(26.83)	(30.48)	(19.37)	(10.74)	(18.08)	(33.16)	(18.50)	(37.75)
95°C- 2 min.	224.95	211.27	207.24	193.46	185.76	181.23	175.38	184.32	181.65	194.49
- 93-80°C	(10.08)	(3.95)	(8.05)	(11.34)	(14.75)	(12.63)	(6.26)	(8.83)	(10.90)	(18.53)
95°C- 3 min.	218.65	207.74	200.93	184.35	179.60	176.37	175.71	184.86	184.44	190.43
- 93-60°C	(4.70)	(9.55)	(2.53)	(5.63)	(12.53)	(10.67)	(7.43)	(11.94)	(7.29)	(16.58)
95°C- 3 min.	215.54	208.86	198.81	186.32	180.29	178.12	174.24	178.83	184.54	189.62
- 93-70°C	(6.09)	(2.28)	(3.37)	(4.73)	(9.70)	(10.74)	(12.16)	(8.73)	(3.70)	(15.80)
95°C- 3 min.	209.47	205.18	195.21	190.13	185.56	186.89	179.07	194.19	204.26	194.44
- 93-80°C	(3.70)	(4.91)	(5.07)	(7.32)	(8.57)	(7.61)	(9.69)	(8.23)	(7.02)	(11.66)
97°C- 2 min.	229.27	213.85	214.66	204.10	206.34	203.62	195.44	200.09	201.76	207.82
- 93-60°C	(6.24)	(6.94)	(7.10)	(7.22)	(5.32)	(3.92)	(7.42)	(8.72)	(13.32)	(11.90)
97°C- 2 min.	230.58	220.16	196.82	173.75	171.55	169.02	168.56	184.55	210.99	190.88
- 93-70°C	(11.21)	(5.85)	(11.14)	(10.76)	(9.02)	(13.31)	(12.75)	(15.77)	(5.54)	(25.03)
97°C- 2 min.	220.25	202.93	183.25	170.00	168.23	162.56	173.33	188.81	189.87	183.82
- 93-80°C	(7.13)	(10.26)	(15.41)	(10.31)	(10.81)	(9.15)	(7.23)	(10.32)	(12.83)	(20.64)
97°C- 3 min.	220.25	206.39	203.49	196.69	191.25	184.63	178.80	186.19	193.43	195.90
- 93-60°C	(8.52)	(3.82)	(5.67)	(5.67)	(10.68)	(11.02)	(11.61)	(11.61)	(10.58)	(14.82)
97°C- 3 min.	211.22	205.32	207.18	194.26	192.39	187.03	185.68	196.62	186.68	196.48
- 93-70°C	(10.32)	(9.92)	(4.04)	(7.66)	(7.30)	(7.87)	(7.88)	(10.92)	(14.27)	(12.28)
97°C- 3 min.	217.82	207.78	202.60	198.49	193.44	190.93	180.18	192.49	193.62	197.57
- 93-80°C	(15.19)	(3.73)	(5.60)	(3.87)	(9.56)	(11.12)	(5.64)	(12.21)	(13.41)	(13.64)

CD at 5% for cooking temperature × cooking duration × adjustment temperature = 14.70 / Différence critique à 5 % pour la température de cuisson × durée de cuisson × température d'ajustement = 14,70. Values in the parenthesis are standard deviation values. / Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs de l'écart type.

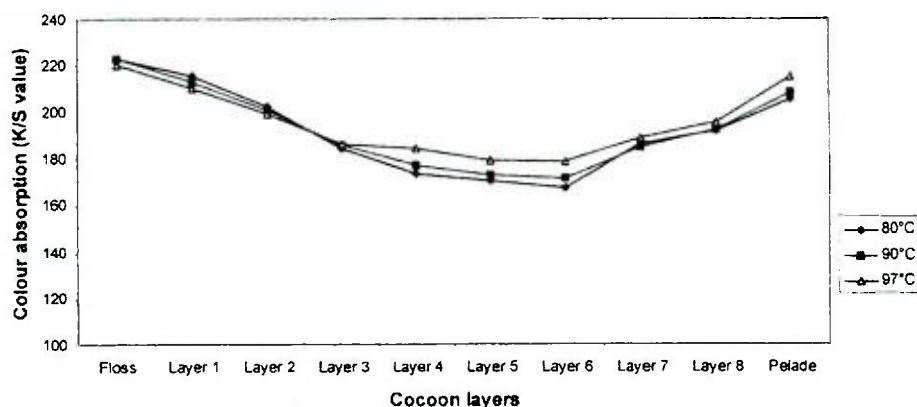


Figure 1. Effect of cooking temperatures on colour absorption in different layers of cocoon shell.

Figure 1. Effet des températures de cuisson sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse.

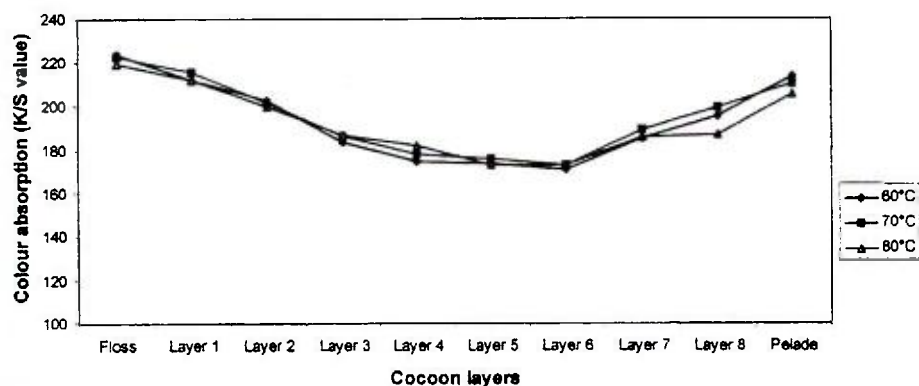


Figure 2. Effect of adjustment temperatures on colour absorption in different layers of cocoon shell.

Figure 2. Effet des températures d'ajustement sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse.

Though the colour absorbency is on the higher side at 97°C, over softening takes place at boiling temperature due to water agitation. Compared to retting and permeation studies, the colour absorbency is increased in all the layers clearly predicting that the water permeation is improved in five-temperature treatment, thus softening the sericin layers effectively. Further it could be observed that all the layers do not show any significant difference in colour absorption in all the cooking temperatures selected for the study. This is attributed to uniform penetration of water through all the layers while passing from outside to inside and inside to outside the cocoon shell, which is achieved by pressure difference created by varying temperature treatment in cooking process.

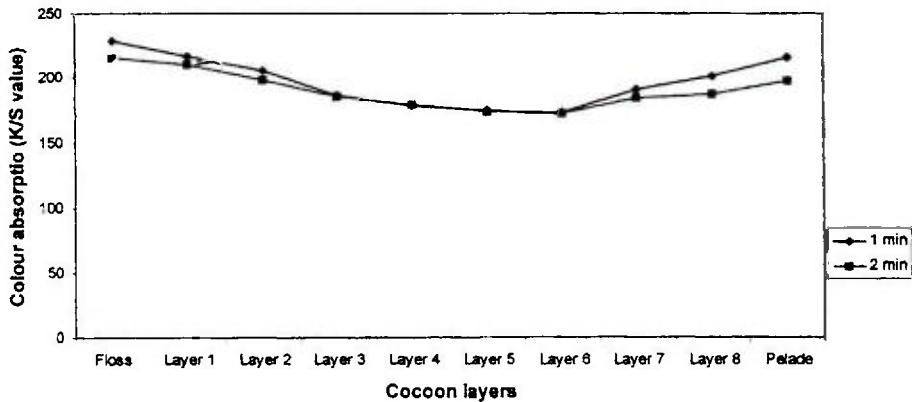


Figure 3. Effect of cooking durations on colour absorption in different layers of cocoon shell.

Figure 3. Effet des durées de cuisson sur l'absorption de la couleur dans différentes couches de la coque soyeuse.

c. Effect of adjustment temperature on colour absorbency after cooking:

The results given in Figure 2 revealed that the adjustment temperature treatment did not show significant difference between the colour absorbency in different adjustment temperature profiles i.e., 93-60°C, 93-70°C and 93-80°C, as indicated by the K/S values in respect of all the layers. Though the results do not show any significant difference in colour absorption in different layers of cocoon shell in all the adjustment temperature selected for the study, but the values are much higher than the single and three temperature treatment i.e. retting and permeation. This is attributed to uniform penetration of water through all the layers while passing from outside to inside and inside to outside the cocoon shell. The higher is the difference between the adjustment temperatures, the more there is pressure difference created from inside to outside of the cocoons which allows the water to diffuse into the cocoon layers.

d. Effect of cooking duration on colour absorbency after cooking:

Colour absorbency is found to decrease in all the layers of the cocoon shell, as the high temperature for cooking duration increased. At 3 minutes treatment colour absorbency is the lowest as seen from the K/S values. Further it was observed that there is no significant difference in colour absorbency in all the layers of the cocoon shell. Figure 3 shows the influence of cooking duration on colour absorbency, which indicated that 2 minutes, treatment gives better absorbency in the cocoon shell layers. The reason that is attributed to this is that at higher cooking durations air is trapped inside the cocoons due to entry suction phenomenon and water penetration is reduced.

e. Interaction of both cooking temperatures, adjustment temperature profiles and cooking duration on colour absorbency:

The interaction effect between the colour absorbency in different layers of cocoon shell and different temperature and duration of cooking and adjustment treatments are given in Table II. It could be observed that both the mean interaction between the cooking temperatures, duration and adjustment temperature profiles showed an increasing trend in different layers of the cocoon shell. The five temperature treatments has uniformly coloured the middle layers. This may be attributed to the uniform wetting of shells by making water penetrate many times in the shell layers during complete cooking of Indian multi-bivoltine cocoons. The results obtained in this study confirms those of Kinoshita, (1997), who studied the variability in the wetting of the cocoon shell and found that in

cocoon shell middle layers the water absorption could be increased by proper cooking treatments. In order to reduce the variability in the wetting of all the shell layers, complete cooking process consisting of retting treatment, high permeation temperature treatment, low permeation temperature treatment, cooking temperature treatment and adjustment temperature profile treatment should be adopted so that uniform softening of sericin in all the layers is achieved with improved productivity and quality of raw silk from multi-bivoltine cocoons.

CONCLUSION

From the above studies, it is inferred that cooking treatments facilitate further softening of sericin in inner layers and by permeating water from inside to outside the cocoon shell layers and once again penetrating water into the cocoons during adjustment treatments. The cooking temperature of 95° C for 2 minutes duration and adjustment temperature profile of 93-60°C permeates the water effectively into the shell layers. Further at very high cooking temperature of 97° C colour absorbency is reduced due to over softening of the sericin and entry suction phenomenon. The retting treatment followed by permeation treatments and cooking treatments softens the sericin uniformly in all the layers due to repeated penetration of water in the cocoon shell, thus yielding more quantity of raw silk with improved quality characteristics from hot air dried Indian multi-bivoltine cocoons.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their gratitude to Mr. B.P.Nair, Assistant director (Stat), CSTRI, Bangalore for his statistical analysis of the results. The thanks are due to reeling section staff of CSTRI, for their cooperation while conducting the study.

REFERENCES

- KATSUNO M. (1969) The effect of pre-treatment temperature and time before cooking on cocoon shell moisture and its variability", *Journal of sericultural science institute*, Vol. 17, pp. 20-26.
- KATSUNO M. (1973) The cocoon shell water absorption based on low pressure permeation treatment", *Journal of sericultural science institute*, Vol. 22, pp. 51-60.
- KINOSHITA H. KUSAMA.T. KOEKE.R. (1982) Studies related to cocoon pre-treatment before cooking, *J.Silk.Sci.Tech.Japan*, Vol.32, pp.10-13.
- KINOSHITA H. (1997) Development of the optimum control method of cooking by the application of expert system, *Bulletin of the National institute of sericultural and entomological science*, No.19, Oct., pp.13-20.
- MORI (1915) Treatment method before cocoon cooking, *Kinnju Sanyu Kai report*, Vol. 109, pp. 2-4.
- NAKAGAWA S. (1932) Cocoon cooking method with low temperature boiling conditions after steam permeation, *The Journal of sericultural science of Japan*, Vol. 14, No. 7, pp. 43-56.
- OGIHARA (1933) "Comments on cocoon cooking: Cooking theory book", *Bunmeido*, Tokyo, pp. 348-354.
- SHIMAZAKI A. KONO. UCHIDA. SAITO. (1966) Analysis of cocoon cooking trend in cocoon cooking process I. Features of light and heavy permeation treatment and steam cooking", *Paper presented during the Filature and silk conference*, Vol. 16, pp. 54-57.
- SHIMAZAKI A. (1983) Subject task force of future reeling technology", *Paper presented in Filature summer seminar - Report*, Vol. 36, pp. 43-62.
- YAMAMOTO A. (1917) Semi sunken cocoon cooking method, *Seishi no tomo book* published in Japan.

ETUDES SUR LA CUISSON DES COCONS POLY BIVOLTINS. TROISIEME PARTIE : EFFET DES TRAITEMENTS DE CUISSON ET D'AJUSTEMENT DANS LA CUISSON EN BAC SUR LA DIFFUSION DE LA COULEUR DANS LA COQUE SOYEUSE

G. HARIRAJ & T. H. SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, Bangalore — 560 068, Inde.

Il se produit un amollissement de la séricine des couches de la coque soyeuse pendant le processus de cuisson. Les températures et les durées utilisées pendant les étapes de cuisson et d'ajustement ramollissent efficacement les couches internes de la séricine de la coque soyeuse aux points de passage. La diffusion de l'eau dans les différentes couches du cocon varie en fonction de la température et de la durée de cuisson. Des études ont été réalisées chez les cocons poly-bivoltins indiens pour analyser l'influence de la température, de la durée de cuisson et de l'ajustement avec le système de cuisson à la casserole sur la diffusion d'eau dans les différentes couches de la coque soyeuse en colorant l'eau de cuisson avec une solution teintée. On analyse les couches du cocon par rapport à l'absorption de la teinture en utilisant un système informatisé de correspondance des couleurs après avoir déroulé les filaments sur des longueurs de 100 m. On observe que la température et que la durée de cuisson ont une influence significative sur la diffusion de l'eau dans les différentes couches de la coque soyeuse. Il est intéressant de noter que le traitement avec cinq températures améliore de manière significative la coloration des couches externe, médiane et interne par comparaison au traitement à trois températures pour les couches médianes. Cela pourrait être attribué à l'action capillaire efficace de l'eau de l'extérieur à l'intérieur des cocons en raison de la différence de pression créée par le traitement avec des températures variées pendant les processus de cuisson et d'ajustement. De plus, on observe que les traitements de cuisson influencent la diffusion de l'eau dans les différentes couches de la coque soyeuse de manière significative comme le montre l'augmentation de l'absorption de la couleur dans les couches. L'étude montre clairement que le système de cuisson à la casserole en utilisant un traitement de cinq températures amollit la séricine de manière plus uniforme dans les différentes couches de la coque soyeuse que le traitement avec une ou trois températures, ce qui facilite un meilleur déroulement des filaments de cocon à partir des cocons indiens poly-bivoltins séchés à l'air chaud et donne un meilleur rendement de soie grège de meilleure qualité.

INTRODUCTION

Le processus de cuisson complète des cocons est une méthode efficace et adaptée au déroulement des filaments de cocons à partir des points d'agglutination entre les couches de séricine. Le processus de cuisson est constitué des parties suivantes : la partie rouissage pendant laquelle les coques soyeuses sont humidifiées avec de l'eau chaude, la partie imprégnation à température élevée pendant laquelle l'air à l'intérieur du cocon s'échappe et crée une différence de pression à l'intérieur du cocon, la partie imprégnation à basse température pendant laquelle les cocons sont soudainement traités avec de l'eau à basse température pour que les cocons absorbent l'eau dans leurs couches, la partie cuisson pendant laquelle l'eau à l'intérieur du cocon sort par les couches du cocon de sorte que la couche interne de

séricine du cocon s'amollit efficacement et la partie ajustement pendant laquelle la température de l'eau diminue progressivement pour permettre au cocon d'absorber une quantité maximum d'eau à l'intérieur du cocon. Pendant ces opérations, la séricine de la coque soyeuse s'amollit convenablement de sorte que le filament du cocon se déroule facilement sans aucune rupture pendant le processus de dévidage.

Avec le processus de cuisson du cocon, l'eau absorbée pendant le processus de pre-traitement est chauffée et la séricine s'amollit / gonfle. De plus, le traitement de cuisson dépend totalement du processus de pre-traitement. L'eau qui pénètre à l'intérieur de la coque soyeuse pendant le processus de pre-traitement est en relation avec la pénétration de l'eau pendant le processus de cuisson. De plus la quantité d'eau qui pénètre dans le cocon est en relation avec la teneur en humidité de la coque soyeuse.

L'absorption de l'eau, la teneur en humidité de la coque soyeuse, l'humidification du cocon et la variabilité d'humidification de la coque soyeuse diffèrent en fonction des conditions de pre-traitement. Mori (1915), Yamamoto (1917), Nakagawa (1932) et Ogihara (1933) ont étudié la méthode d'absorption de l'eau par les cocons pendant le traitement d'imprégnation. L'effet du pre-traitement de la coque soyeuse et la diffusion de l'eau dans les couches de la coque soyeuse a été étudié Shimazaki, (1966 et 1983) et Kinoshita et coll., (1982). Katsuno (1969 et 1973) a étudié l'importance du processus de pre-traitement sur l'absorption de l'eau et la teneur en humidité de la coque. Nous avons essayé dans cette étude d'étudier la diffusion de l'eau dans les couches de la coque soyeuse chez les cocons poly-bivoltins indiens séchés à l'air chaud en colorant l'eau de cuisson avec une solution teintée.

MATERIELS ET METHODES

Matériel brut :

Des cocons poly-bivoltins disponibles commercialement (PM × NB4D2) élevés dans l'état du Karnataka en Inde pendant le mois de juin 1998 ont été utilisés pour l'étude.

Conditions de séchage :

Les cocons sont séchés dans un séchoir à air chaud en lots, en suivant un programme de températures de 130° C-120° C – 110° C – 100° C – 90° C – pendant une période de 5 heures. Le degré de séchage atteint est de 36 à 38 %.

Conditions de rouissage :

Les cocons séchés sont mis dans une cage et rouis à 50° C pendant 1 minute dans le premier bac de cuisson.

Conditions d'imprégnation :

Les cocons rouis sont immédiatement traités à une température d'imprégnation élevée de 90° C pendant une durée de 2 minutes dans le deuxième bac de cuisson, suivi par un traitement à basse température d'imprégnation de 60° C pendant une durée de 1 minute dans le premier bac du système de cuisson en bac.

Conditions de cuisson et d'ajustement :

Après avoir été rouis et imprégnés les cocons sont immédiatement traités à une température de 93° C, 95° C ou 97° C pendant une durée de 2 minutes ou 3 minutes dans la deuxième casserole de cuisson puis en versant de l'eau froide dans la deuxième casserole. Après la cuisson des cocons, ils sont laissés dans le même bain sans aucun apport de vapeur pendant une minute. Puis, on ajoute une petite quantité d'eau au bain pendant une minute, pour faire baisser la température de 93° à 90° C. On ajoute de l'eau au bain progressivement de sorte qu'en une durée de 2 minutes, la température de

l'eau passe de 80° C, 70° C à 60° C. Les cocons sont conservés à la même température pendant une minute puis ils sont retirés du bain de cuisson pour être purgés. La période totale d'ajustement dure donc 4 minutes et la cuisson se fait dans des bacs.

Procédure expérimentale :

On prépare une solution colorée en utilisant une teinture acide (Acidol grey SBL, Sandoz Ltd, Inde) à une concentration de 0,2 g / l. On utilise 300 ml de solution teintée pour chaque bain de cuisson et 50 cocons. L'eau colorée est chauffée jusqu'au niveau requis puis 50 cocons dans une cage spécialement conçue sont plongés dans l'eau pour permettre à l'eau colorée de passer dans les couches du cocon. Les cocons teints sont dévidés un à un en utilisant une éprouvette dans de l'eau claire maintenue à 80° C. La couche de blaze est purgée et retirée et des échantillons de 100 m de filament de soie dévidé sont recueillis séparément. La pélette est aussi recueillie séparément. Les échantillons de filament, de blaze et de pélette sont séchés à température ambiante avant d'être évalués plus en détail (Kinoshita, 1997).

Analyse des données :

On mesure ensuite la force de la couleur dans les couches colorées en utilisant un système de correspondance des couleurs chromafash. On trouve d'abord la force de la couleur en terme de valeurs K/S de la couche de blaze et on mesure la différence de passage de la couleur tous les 100 mètres et l'estimation pour la pélette est réalisée dans une fourchette de lumière visible de 400 à 700nm en utilisant l'équation de Kubelka Munk.

$$K/S = (1 - R^* 0,01)^2 / (2 * R^* 0,01)$$

Où

K = Coefficient d'absorption

S = Coefficient de diffusion

R = % de réflexion

On prend soin d'exposer les échantillons à un niveau de lumière uniforme. Les données ainsi obtenues sont analysées de manière statistique en utilisant un système SPSS.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'analyse de variance des couches de la coque soyeuse présentés dans le Tableau I montrent qu'il existe une différence significative entre les durées et les températures de cuisson et les profils d'ajustement de la température de cuisson chez les cocons poly-bivoltins indiens. L'absorption moyenne de la couleur dans la couche de blaze, les couches du filament de soie et la pélette des cocons poly-bivoltins indiens traités avec des températures de cuisson, et d'ajustement et des durées de cuisson différentes dans le cas du traitement à cinq températures est présentée sur les Figures 1 à 3. Les effets de l'interaction entre les températures et les durées de cuisson et les programmes d'ajustement de la température sur les caractéristiques d'absorption de la couleur sont présentés dans le Tableau II.

a. Résultats de l'analyse de variance sur les caractéristiques d'absorption de la couleur après une cuisson complète :

Les résultats de l'analyse de variance présentés dans le Tableau I montrent qu'il y a une différence significative au seuil de 1 %, entre les températures de cuisson et entre les durées de cuisson par rapport à l'absorption de la couleur dans les différentes couches de la coque soyeuse tandis que le programme d'ajustement de la température n'a pas d'influence significative sur l'absorption de la couleur. D'après l'effet de corrélation croisée, on a pu observer que l'interaction entre la température de cuisson et la durée de cuisson, la température de cuisson et le programme d'ajustement de la

température et entre la durée de cuisson et le programme d'ajustement de la température ont un effet significatif au seuil de 1 % sur l'absorption de la couleur. Les corrélations croisées à trois facteurs entre la température de cuisson, la durée de cuisson et le programme d'ajustement de la température montrent une relation significative au seuil de 5 % pour l'absorption de la couleur. Le facteur de contribution de la température de cuisson, des programmes d'ajustement de la température et de la durée de cuisson sur l'absorption de la couleur sont respectivement de 6,16 %, 3,17 % et 0,02 %.

b. Effet de la température de cuisson sur l'absorption de la couleur après la cuisson :

Les résultats présentés sur la Figure 1 montrent qu'alors que la température de cuisson augmente l'absorption de la couleur dans toutes les couches augmente d'une manière curvilinéaire. La couleur dans les couches médianes augmente à 97° C et comparativement moins à 93° C de température de cuisson, comme le montrent les valeurs K/S pour toutes les couches. Cependant, l'absorption de la couleur ne change pas entre les températures de cuisson sélectionnées pour l'étude. Cela pourrait être dû au fait qu'après la cuisson complète des cocons poly-bivoltins, un maximum d'eau pénètre à l'intérieur des cocons en raison de la structure de la coque des cocons.

Bien que l'absorption de la couleur soit plutôt élevée à 97° C, il se produit un trop grand ramollissement à la température d'ébullition en raison de l'agitation de l'eau. Par comparaison aux études sur le rouissage et la pénétration, l'absorption de la couleur augmente dans toutes les couches ce qui montre clairement qu'il y a une amélioration de la pénétration de l'eau avec le traitement à cinq températures, ce qui amollit efficacement les couches de séricine. De plus, on a pu observer que toutes les couches ne montrent pas de différence significative d'absorption de la couleur avec toutes les températures de cuisson sélectionnées pour l'étude. Cela est attribué à la pénétration uniforme de l'eau par les couches pendant qu'elle passe de l'extérieur à l'intérieur et de l'intérieur à l'extérieur de la coque soyeuse, obtenue grâce à la différence de pression créée par le traitement à températures variées pendant le processus de cuisson.

c. Effet de la température d'ajustement sur l'absorption de la couleur après la cuisson :

Les résultats présentés sur la Figure 2 montrent qu'il n'y a pas de différence significative d'absorption de la couleur avec les différents profils d'ajustement de la température. 93-60° C, 93-70° C et 93-80° C, comme le montrent les valeurs K/S pour toutes les couches. Bien que les résultats ne montrent pas de différence significative d'absorption de la couleur dans les différentes couches de la coque soyeuse pour toutes les températures d'ajustement sélectionnées dans l'étude les valeurs sont beaucoup plus élevées qu'avec le traitement à une et à trois températures, c'est à dire le rouissage et la perméation. On attribue cela à la pénétration uniforme de l'eau dans les couches tandis qu'elle passe de l'extérieur à l'intérieur et de l'intérieur à l'extérieur de la coque soyeuse. Plus la différence entre les températures d'ajustement est élevée, plus la différence de pression créée, qui permet à l'eau de se diffuser dans les couches du cocon, est importante de l'intérieur à l'extérieur des cocons.

d. Effet de la durée de cuisson sur l'absorption de la couleur après la cuisson :

On trouve que l'absorption de la couleur baisse dans toutes les couches de la coque soyeuse lorsque la durée de cuisson à température élevée augmente. Avec un traitement de 3 minutes, l'absorption de la couleur est la plus basse. De plus, on observe qu'il n'y a pas de différence significative d'absorption de la couleur dans toutes les couches de la coque soyeuse. La figure 3 montre l'influence de la durée de cuisson sur l'absorption de la couleur et indique qu'un traitement de 2 minutes donne une meilleure absorption dans les couches de la coque soyeuse. On attribue cela au fait que pendant des durées de cuisson plus longues, l'air est emprisonné à l'intérieur des cocons en raison d'un phénomène de succion à l'entrée et la pénétration de l'eau diminue.

e. Interaction entre les températures de cuisson, les profils d'ajustement de la température et la durée de la cuisson sur l'absorption de la couleur :

L'effet d'interaction entre l'absorption de la couleur dans les différentes couches de la coque soyeuse, les différentes températures et durées de cuisson et les traitements d'ajustement sont présentés dans le Tableau II. On peut observer que l'interaction moyenne entre les températures, la durée de cuisson et les profils d'ajustement de la température présente une tendance à l'augmentation dans les différentes couches de la coque soyeuse. Le traitement à cinq températures colore les couches médianes de manière uniforme. Cela pourrait être attribué à l'humidification uniforme des coques, qui fait pénétrer l'eau plusieurs fois dans les couches de la coque pendant une cuisson complète des cocons poly-bivoltins indiens. Les résultats obtenus dans cette étude confirment ceux de Kinoshita (1997), qui a étudié la variabilité de l'humidification de la coque soyeuse et trouvé que dans les couches médianes de la coque soyeuse, on peut augmenter l'absorption de l'eau avec des traitements de cuisson adaptés. Pour réduire la variabilité de l'humidification dans toutes les couches de la coque, un processus de cuisson complet avec un traitement de rouissage, un traitement à température d'imprégnation élevée, un traitement à température d'imprégnation basse, un traitement à température de cuisson et un traitement d'ajustement du profil de température doit être adopté de manière à obtenir un amollissement uniforme de la séricine dans toutes les couches avec une amélioration de la productivité et de la qualité de la soie grège chez les cocons poly-bivoltins.

CONCLUSION

D'après notre étude, nous déduisons que les traitements de cuisson facilitent d'avantage l'amollissement de la séricine dans les couches internes en faisant passer l'eau de l'intérieur à l'extérieur des couches de la coque soyeuse et en faisant pénétrer l'eau une fois de plus dans les cocons avec les traitements d'ajustement. La température de cuisson de 95° C pendant une durée de 2 minutes et un ajustement de la température de 93-60° C fait pénétrer l'eau efficacement dans les couches de la coque. De plus, à une température de cuisson très élevée de 97° C, l'absorption de la couleur diminue en raison d'un trop grand ramollissement de la séricine et d'un phénomène de succion à l'entrée. Le traitement de rouissage suivi par les traitements d'imprégnation et les traitements de cuisson amollit la séricine de manière uniforme dans toutes les couches en raison de la pénétration répétée de l'eau dans la coque soyeuse, ce qui donne une quantité plus importante de soie grège avec une amélioration des caractéristiques de qualité des cocons poly-bivoltins indiens séchés à l'air chaud.

INDUCTION OF HAPLOID PLANTS IN MULBERRY VARIETY – S54 (*MORUS INDICA* L.) BY *IN VITRO* CULTURE OF UNPOLLINATED OVULES

R. KAVYASHREE, M. C. GAYATRI & H. M. REVANASIDDIAH*

Tissue Culture and Cytogenetics Laboratory, Department of Botany, Bangalore University,
Bangalore – 560 056, India.

Haploid plants have been obtained from unpollinated ovules of mulberry variety – S54 when cultured in vitro on half strength LSBM supplemented with 8% sucrose and BAP (2 mg l^{-1}). After 8 weeks of culture, the shoot primordia were initiated and these shoot primordia were transferred to full strength LSBM supplemented with BAP (2 mg l^{-1}) to obtain multiple shoots. These multiple shoots were transferred for rooting on full strength LSBM supplemented with BAP (2 mg l^{-1}) and NAA (1 mg l^{-1}). The well developed shoots with roots were hardened and transferred to field. The haploid plants derived from unpollinated ovule culture were screened cytologically and they showed haploid number of chromosomes $n=14$ in their root tips. The ploidy level was also confirmed by counting the number of chloroplasts in the stomatal guard cells, which showed 8 chloroplasts.

Keywords: Mulberry, variety-S54, ovule culture, haploids, chromosome number, chloroplast number.

Abbreviations:	LSBM	Linsmaier and Skoog's Basal Medium
	BAP	6 - Benzyl Amino Purine
	NAA	1 - Naphthalene Acetic Acid
	HgCl ₂	Mercuric chloride
	HCl	Hydrochloric acid
	h	Hours

INTRODUCTION

In vitro induction of haploids now occupies an important place among the techniques available to plant breeder. It offers new opening for genetic manipulation (Lakshmisita and Ravindran, 1991). This technique has been widely used for crop improvement programmes in several countries (Hu and Yang, 1986; Bajaj, 1990).

Mulberry (*Morus* spp.) is an invaluable tree of immense economic importance in silk industry due to its foliage, which constitutes the chief food for the silkworm *Bombyx mori* L. The highly heterozygous, perennial nature of the plant coupled with prolonged juvenile period limits the speed of the genetic improvement in this crop. Further, dioecious nature of the important mulberry varieties in this taxon and genetic linkage of desirable quality traits limits the genetic improvement by conventional hybridization techniques. Moreover, in vegetatively propagated plants like mulberry it takes several years to evolve a clone with desirable economic and commercial traits with breeding

* Silkworm Genetics and Breeding Laboratory, Department of Zoology, Bangalore University, Bangalore – 560 056.

techniques. (Ravindran *et al.*, 1988). First successful gynogenic haploids were obtained from barley by San Neoum in 1976. Since then ovule and ovary culture has been used as an alternative method to anther culture for obtaining haploid plants especially in those plants where anther culture has failed or given unsatisfactory results (Cappadocia and Vieth, 1990).

Keeping this in view, in the present study, an attempt has been made to induce haploid plants using unpollinated ovules dissected from *in vivo* developed gynoeceum from the female clone of Mulberry variety – S54.

MATERIAL AND METHODS

Unpollinated inflorescence of *Morus indica* L. cultivar S54, a popular beneficial mutant bearing unisexual female flowers was used as the source material, collected from the Mulberry germplasm bank, Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore.

The branches containing one-week-old young female inflorescence were bagged with polythene covers to avoid cross pollination. After 2-3 weeks, the polythene covers were removed and the unpollinated female inflorescences were collected, washed thoroughly in tap water, surface sterilized by using liquid detergent Laboline 5% (v/v), given a rinse in 70% ethanol for 30 seconds, disinfected in 0.1% Mercuric chloride (HgCl_2) for 3 minutes and rinsed several times in sterile water to remove traces of HgCl_2 . Then, the individual gynoeceum was separated from the unpollinated inflorescence and dissected to detach single pendulous ovule. The dissected unpollinated ovules were cultured on both half strength and full strength Linsmaier and Skoog's basal medium (LSBM) (1965) with 3%, 4%, 8% and 12% sucrose (Table I). These cultures were maintained in the culture room at a temperature $25 \pm 2^\circ \text{C}$ with light intensity 3000 lux and Relative Humidity (RH) 55%. The root tips of *in vitro* raised plants from ovule culture were subjected to ploidy determination. The root tips were rinsed in tap water and treated with 0.02% 8-hydroxyquinoline at 4°C for 3 h. The root tips were fixed in Modified Carnoy's fluid containing absolute Alcohol : Chloroform : Glacial acetic acid (6:4:1) for 24 h. The fixed root tips were stained with 2% Aceto Orcein and squashed. The slides were screened to confirm the chromosome number.

The ploidy level was also determined by counting the number of chloroplasts in stomatal guard cells of haploids. The lower epidermis of young leaves were stripped and stained with Lugol's iodine solution which contains 2% Potassium iodide and 1% iodine solution. The number of chloroplasts was counted in each guard cell.

The data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the variation in the number of shoots and roots between and within the treatments.

RESULTS

Regeneration:

It was noticed that full strength LSBM supplemented with BAP (2 mg l^{-1}) at 3, 4, 8 and 12% sucrose concentrations yielded poor response in inducing shoot primordia from the unpollinated ovules (Table I). However, it was observed that the half strength LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) + sucrose (8%) was found to be optimum concentration in inducing shoot primordia when compared to 3, 4 and 12% sucrose concentrations.

The unpollinated ovule (Fig. 1) gave rise to tiny green shoot primordium on half strength LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) + sucrose (8%) after 8 weeks of culture (Figs. 2, 3 & 4) (Table I). These tiny green shoot primordia was transferred to LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) for multiplication. After 4 weeks of transfer, 10-12 multiple shoots were formed from the green shoot primordia originated from the ovule (Figs. 5 & 6) (Table II). The well developed multiple shoots were subcultured on LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) + NAA (1 mg l^{-1}) for rooting (Table III).

Table I. Effect of media, concentration of sucrose and BAP on shoot initiation from unpollinated ovule of mulberry variety-S54.*Tableau I. Effet de la concentration du milieu en saccharose et en BAP sur la formation de la pousse à partir d'un ovule non pollinisé de la variété de mûrier S54.*

Basal Media	Sucrose (%)	BAP (mg l ⁻¹)	Response (%)	No. of shoot buds/explant $\bar{A} \pm SD$
<i>Milieu de base</i>	<i>Saccharose (%)</i>		<i>Réponse (%)</i>	<i>Nbre de bourgeons de pousses / explant</i> $\bar{A} \pm \text{Ecart type}$
½ LS	3	0	08	0.1 ± 0.32
½ LS	4	0	16	0.1 ± 0.32
½ LS	8	0	25	0.3 ± 0.48
½ LS	12	0	17	0.2 ± 0.42
½ LS	3	2	42	0.4 ± 0.52
½ LS	4	2	58	0.6 ± 0.52
½ LS	8	2	92	0.9 ± 0.32
½ LS	12	2	67	0.6 ± 0.52
LS	3	0	0	0
LS	4	0	0	0
LS	8	0	08	0.1 ± 0.32
LS	12	0	08	0.1 ± 0.32
LS	3	2	16	0.2 ± 0.42
LS	4	2	25	0.3 ± 0.48
LS	8	2	33	0.3 ± 0.48
LS	12	2	25	0.2 ± 0.42

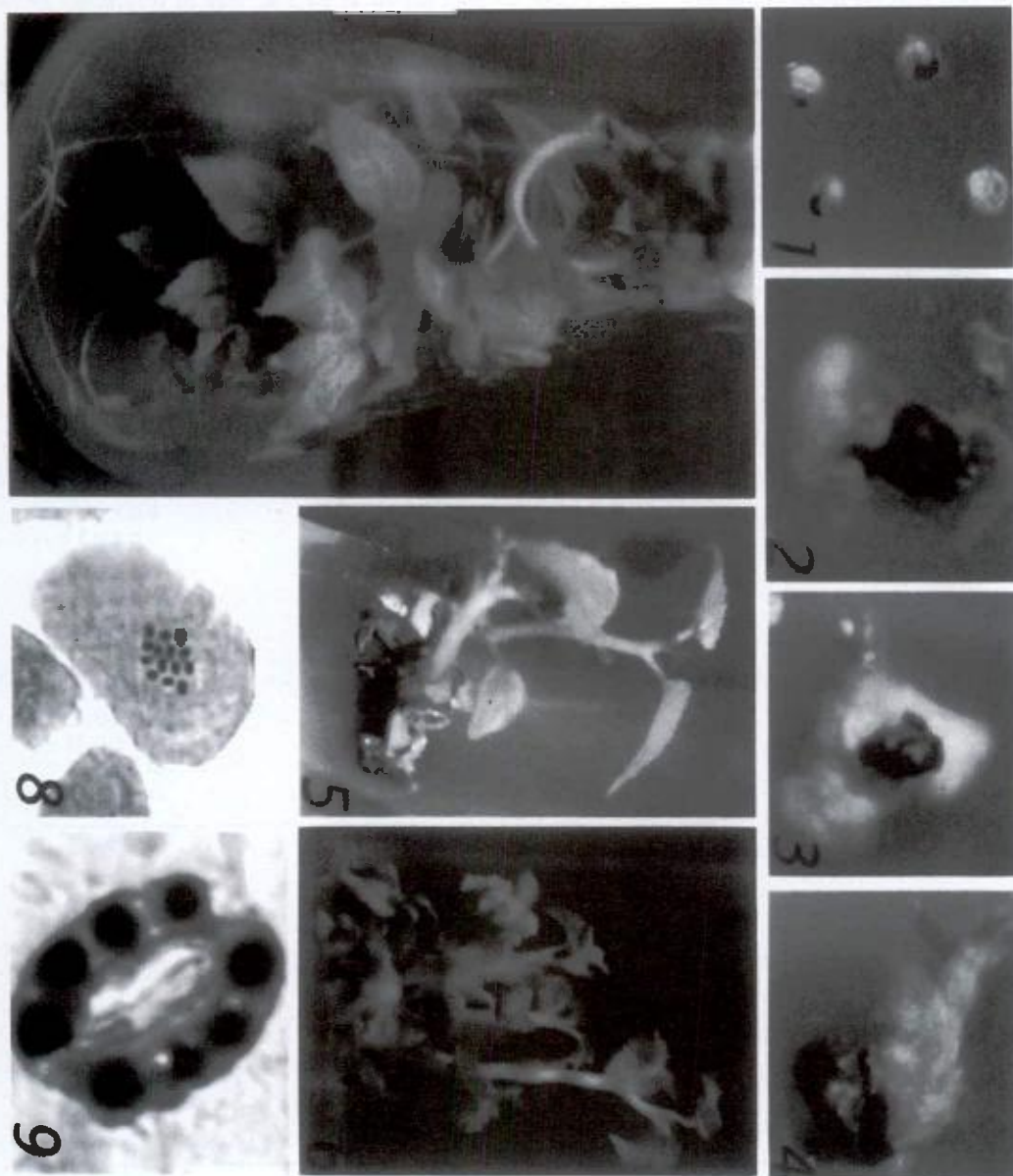
ANOVA Table. (for no. of shoot buds/explant).*Tableau ANOVA. (pour le nombre de bourgeons de pousses / explant).*

SV	DF	SS	MSS	F _{cal} ratio	F _{tab} value**	CD
Treatments / Traitements	15	9	0.61	3.83	1.67	0.35
Error / Ecart	144	23	0.16			
Total	159	32				

DF: Degree of freedom / *Degré de liberté*. **SS:** Sum of squares / *Somme des carrés*. **MSS:** Mean Sum of Squares / *Moyenne de la somme des carrés*.

*: Mean of 10 replications / *Moyenne de dix répétitions*.

** : Significant F value @ 5% level / *Valeur F significative à un seuil de 5 %*.



Figures showing the induction of haploid plants from unpollinated ovule culture of mulberry variety-S₅₄.
Figures présentant l'induction de plants haploïdes à partir d'une culture d'ovule non pollinisé de la variété de mûrier S₅₄.

Fig. 1. The dissected unpollinated ovule explant at culture on half strength LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + sucrose (8%).

Fig. 1. Explant d'ovule non pollinisé disséqué en culture sur du LSBM demi-concentré + BAP (2 mg l⁻¹) + saccharose (8 %).

Figs. 2, 3 & 4. Initiation of tiny green shoot primordium on half strength LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + sucrose (8%) after 8 weeks of culture.

Figs. 2, 3 & 4. Début d'une minuscule pousse verte du primordium sur du LSBM demi-concentré + BAP (2 mg l⁻¹) + saccharose (8 %) après 8 semaines de culture.

Figs. 5 & 6. Multiple shoot formation on full strength LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) after 4 weeks of transfer.

Figs. 5 & 6. Formation de pousses multiples sur du LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) après 4 semaines de transfert.

Fig. 7. Rooted multiple shoots on full strength LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + NAA (1 mg l⁻¹) after 2 weeks of subculture.

Fig. 7. Pousses multiples racinées sur du LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + NAA (1 mg l⁻¹) après 2 semaines de sous-culture.

Fig. 8. Root tip cell showing haploid number of chromosomes n=14.

Fig. 8. Cellule du bout de la racine présentant un nombre haploïde de chromosomes n = 14.

Fig. 9. Stomatal guard cells showing 8 chloroplasts.

Fig. 9. Cellules stomatales de garde présentant 8 chloroplastes.

After 2 weeks of subculture, the well developed plantlets with roots (Fig. 7) were transferred to net pots containing potting mixture peat:perlite:sand in the ratio 50:25:25 (v/v) for hardening and established in soil with survival percentage of 78%.

Statistical Analysis:

The results obtained in the present study from 16 independent experiments were subjected to one-way analysis of variance to study the difference between and within the treatments. It was found that half strength LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + sucrose (8%) showed highest response of 92% and highest mean number of 0.9 for shoot bud formation per explant (Table I). The data reveals that full strength LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) and LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + NAA (1 mg l⁻¹) was the best media for multiple shoot and root formation with 9.3 and 6.8 mean number per explant respectively. Further, critical difference (CD) was calculated and of the 120 pairs of treatments 43 pairs; of the 15 pairs of treatments 14 pairs; of the 28 pairs of treatments 20 pairs were found to be significantly different for shoot buds, multiple shoots and root formation respectively.

Table II. Effect of cytokinin on shoot multiplication from unpollinated ovule culture of mulberry variety-S₅₄.*Tableau II. Effet de la cytokinine sur la multiplication de la pousse à partir d'un ovule non pollinisé de la variété de mûrier S₅₄.*

Basal media	BAP (mg l ⁻¹)	No. of shoots/explant $\bar{A} \pm SD$
Milieu de base		Nbre de pousses / explant $\bar{A} * \pm \text{Ecart type}$
½ LS	2	2.1 ± 0.88
LS	1.0	4.9 ± 0.74
LS	1.5	6.4 ± 0.97
LS	2.0	9.3 ± 0.67
LS	2.5	7.2 ± 1.03

ANOVA Table. (for no. of shoots/explant).*Tableau ANOVA.* (pour le nombre de pousses / explant).

SV	DF	SS	MSS	F _{cal} ratio	F _{tab} value**	CD
Treatments / Traitements	4	289	72.27	95.93	2.59	0.78
Error / Ecart	45	34	0.75			
Total	49	323				

DF: Degree of freedom / Degré de liberté. **SS:** Sum of squares / Somme des carrés. / **MSS:** Mean Sum of Squares / Moyenne de la somme des carrés.

*: Mean of 10 replications / Moyenne de 10 répétitions.

** : Significant F value @ 5% level / Valeur F significative au seuil de 5 %.

Cytology:

The *in vitro* raised plants from unpollinated ovules were screened cytologically. The chromosome counts were made using root tips of each plant. All the plants showed haploid number of chromosomes $n=14$ (Fig. 8). None of the plants showed diploid number ($2n=28$) of chromosomes in their root tips.

Chloroplast index:

The ploidy level was also determined by counting the number of chloroplasts in the 2 guard cells of the stomata. The haploids had 8 chloroplasts in two guard cells of the stomata (Fig. 9) whereas diploids had 10-11 chloroplasts.

DISCUSSION

Recent advances in plant tissue culture have resulted in the successful induction of haploids from unpollinated ovaries (Yang and Zhou, 1982; Truong and Demarly, 1984; Yi *et al.*, 1996) and ovules (Doctrinal *et al.*, 1989; Campion and Alloni, 1990; Miyoshi and Asakura, 1996; Tosca *et al.*, 1999) in crop species as an alternative technique for anther culture and proved to be promising in crop and tree improvement programmes (Prakash and Chand, 1999). Mulberry improvement programmes have been hampered due to long life cycle, heterozygosity, polyploidy, dioecy and extensive out breeding. Further, factors like selection of parent plants for obtaining ovules, optimum size of the ovule, basal media and culture conditions influence *in vitro* response from ovules (Prakash and Chand, 1999).

Table III. Effect of different auxins on root formation from unpollinated ovule culture of mulberry variety-S54.

Tableau III. Effet de différentes auxines sur la formation de racines à partir d'une culture d'ovule non pollinisé de la variété de mûrier S54.

Basal Media	BAP (mg l ⁻¹)	NAA (mg l ⁻¹)	IAA (mg l ⁻¹)	No. of roots/explant A ± SD
<i>Milieu de base</i>				<i>Nbre de racines / explant A ± Ecart type</i>
LS	2	0.5	0	4.8 ± 1.03
LS	2	1.0	0	6.8 ± 1.03
LS	2	1.5	0	5.7 ± 0.95
LS	2	2.0	0	5.2 ± 0.79
LS	2	0	0.5	3.3 ± 1.06
LS	2	0	1.0	3.9 ± 0.74
LS	2	0	1.5	4.1 ± 0.74
LS	2	0	2.0	4.5 ± 0.85

ANOVA Table. (for no. of roots/explant).

Tableau ANOVA. (pour le nombre de racines / explant).

SV	DF	SS	MSS	F _{cal} ratio	F _{tab} value**	CD
Treatments / Traitements	7	86	12.3	4.93	2.15	0.81
Error / Ecart	72	59	0.82			
Total	79	145				

DF: Degree of freedom / *Degré de liberté*. **SS:** Sum of squares / *Somme des carrés*. **MSS:** Mean Sum of Squares / *Moyenne de la somme des carrés*.

*****: Mean of 10 replications / *Moyenne de 10 répétitions*.

******: Significant F value @ 5% level / *Valeur F significative au seuil de 5 %*.

Plants from gynoeceium culture of mulberry have been reported by Lakshmi Sita and Ravindran., (1991), Thomas *et al.*, (1999) and Kavyashree *et al.*, (2001). However, plants from *in vitro* culture of ovule are not reported so far in mulberry. In the present study, *in vitro* cultures of individual *in vivo* unpollinated ovules of *Morus indica* L. Cv-S54 produced tiny green shoot primordial on half strength LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) + sucrose (8%) after 8 weeks of culture and by transfer on to full strength LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) produced multiple shoots after 12 weeks of culture. This agrees with the findings of Kobayashi *et al.*, (1993) that 8% sucrose concentration was superior to induce response from ovule in sweet potato culture. Further, our findings coincides with the report of Cagnet-Sitbon (1980) who has reported that unfertilized ovule respond in culture only when their size was larger than half that of the ovary cavity. Our results have shown that the conditions such as culture media, uptake of growth regulator, high percentage of sucrose to obtain plants from ovule culture is similar to the observations of Rubery and Sheldrake (1974) and Jacobson *et al.*, (1961). Further, membrane permeability played a determining role in the morphogenesis of *in vitro* cultured ovule of mulberry as described by Cousson and Tran Thanh Van (1981) in *Nicotiana*.

In the present study, the statistical analysis of variance showed that there exists a highly significant difference between and within the treatments. It was found that half strength LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) + sucrose (8%) revealed highest mean number of shoot buds with 92% response and full strength LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) and LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) + NAA (1 mg l^{-1}) was significantly superior for multiple shoot and root formation respectively.

Of the 50 plants transferred to soil, 38 plants survived (78%). These 38 plants were screened cytologically. None of the plants were found to be diploids or aneuploids and they were all haploids with $n=14$ chromosomes.

The above findings were further supported by the number of chloroplast in stomatal guard cell. It was found that in Cv- S54, haploids derived from unpollinated ovules have 8 chloroplasts in two guard cells of the stomata (each guard cell contain 4 chloroplasts). This agrees with the findings of Yang and Yang (1995) in mulberry and Doctrinal *et al.*, (1989) in *Beta vulgaris*. This indicates that the heredity of chloroplast number bears a close relationship in chromosome number as suggested by Yang and Yang (1995).

Ovule culture offers, potentially wide possibilities in genetic and breeding investigations. So far, haploid plants in *Morus* spp. with consistent genetic make up was not practically evolved. However, the results obtained in the present study can possibly bring the expected practical success for obtaining pure strains, which could be used for breeding new varieties.

ACKNOWLEDGEMENT

The financial assistance given by Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) to one of the authors Kavyashree. R., is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- BAJAJ Y.P.S. (1990). *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In : Y.P.S. Bajaj (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry : Haploids in crop improvement I, Vol. 12, Springer-Verlag, Berlin, pp. 3-44.
- CAGNET-SITBON M. (1980). Recherches preliminaires sur la production d'haploides de *Gerbera jamesonii* par culture d'antheres et d'ovules non fecondes *in vitro*. These 3^e Cycle, Univ Paris XI, Centre d'Orsay, France.
- CAMPION B. & ALLONI, C. (1990). Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 20 : 1-6.

- CAPPADOCIA M. & VIETH J. (1990) *Gerbera Jamesonii* H. Bolus ex Hook : *In vitro* production of Agriculture and Forestry : Haploids in crop improvement 1, Vol. 12, Y.P.S.Bajaj (ed.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 417-427.
- COUSSON A. & TRAN THANH VAN K. (1981). *In vitro* control of de novo flower differentiation from tobacco thin cell layers cultured on a liquid medium. *Physiol. Plant.* 51 : 77-84.
- DOCTRINAL M., SANGWAN R.S. & SANGWAN-NORREEL, B.S. (1989). *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 17: 1-12.
- HU H. & YANG, H.Y. (1986). Haploids of higher plants *in vitro*. China Academic Publishers, Beijing/ Springer – Verlag, Berlin.
- JACOBSON L., HANNAPEL R.J., SCHAEDELE M. & MOORE, D.P. (1961). Effect of root to solution ratio in ion absorption experiments. *Plant Physiol.* 36 : 62-65.
- KAVYASHREE R., GAYATRI M.C. & REVANASIDDIAH H.M. (2001). A repeatable protocol for the production of gynogenic haploid plants in mulberry. *Sericologia*, 41(3): 517-521.
- KOBAYASHI R.S., SINDEN S.L. & BOUWKAMP J.C. (1993). Ovule culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and closely related species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 32 : 77-82.
- LAKSHMISITA G. & RAVINDRAN S. (1991) Gynogenic plants from ovary cultures of mulberry (*Morus indica*). In : J.Prakash and Pirek, R.L.M. (Eds.). *Horticulture : New Technologies and Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 225-229.
- LINSMAIER E.M. & SKOOG F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18 : 100-127.
- MIYOSHI K. & ASAKURA N. (1996). Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Plant Cell Rep.*, 16 : 1-2, 1-5; 17 ref.
- PRAKASH D.V.S.S.R. & SURESH CHAND. (1999). Gynogenic haploids – Problems and perspectives : Ovary culture of *Boswellia serrata* Roxb. (Burseraceae). In: Irfan A. Khan and Atiya Khanum (Eds). *Role of Biotechnology in medicinal and aromatic plants Vol. II*, Ukaaz publications, 185-197.
- RAVINDRAN S., DANDIN S.B. & JAIN A.K. (1988). Application of Plant cell, tissue and organ culture in mulberry improvement programmes. *Indian Silk* (Dec. Ed.) : 37-39.
- RUBERY P.H. & SHELDRAKE A.R. (1974). Carrier-mediated auxin transport. *Planta*, 118 : 101-102.
- SAN NOEUM L.H. (1976). Haploides d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* non fécondes. *Ann Amélior Plant* 26 : 751-754.
- THOMAS D.T., BHATNAGAR A.K., RAZDAN M.K. & BHOJWANI S.S. (1999). A reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry, *Morus alba* L. *Euphytica* 110 : 169-173.
- TOSCA A., ARCARA, L. & FRANGI P. (1999). Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in *Gerbera*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 59 : 77-80.
- TRUONG A.I. & DEMARLY Y. (1984). Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays*) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 92 : 309-320.
- YANG J.H. & YANG X.H. (1995). Relationship between stomatal chloroplast number and ploidy levels in mulberry (*Morus* spp.). *Sericologia*, 35(2) : 289-292.
- YANG H.Y. & ZHOU C. (1982). *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theor. Appl. Genet.*, 63 : 97 – 104.
- YI G.H., OH B.G., KIM H.Y. & SOHN J.K. (1996). Plant regeneration from unpollinated ovary culture in rice. *Korean J. Breeding* (Korea Republic), 28(2) : 190-193.

INDUCTION DE PLANTS HAPLOIDES CHEZ LA VARIÉTÉ DE MURIER - S54 (*MORUS INDICA* L.) PAR LA CULTURE *IN VITRO* D'OVULES NON POLLINISÉS

R. KAVYASHREE, M. C. GAYATRI & H. M. REVANASIDDAIAH*

Tissue Culture and Cytogenetics Laboratory, Department of Botany, Bangalore University,
Bangalore – 560 056, Inde.

On a obtenu des plants haploïdes à partir d'ovules non pollinisés de la variété de mûrier S54 quand on les cultive *in vitro* sur du LSBM à moitié concentré additionné de saccharose à 8 % (2 mg l^{-1}) et de BAP. Après 8 semaines de culture, les primordia de la pousse commencent et ces primordia sont transférés sur du LSBM additionné de BAP (2 mg l^{-1}) pour obtenir des pousses multiples. Ces pousses multiples sont transférées pour le racinement sur du LSBM complet additionné de BAP (2 mg l^{-1}) et de NAA (1 mg l^{-1}). Les pousses bien développées avec des racines sont transférées sur le terrain. Les plants haploïdes dérivés de la culture d'ovule non pollinisé sont analysés sur le plan cytologique et présentent effectivement un nombre haploïde de chromosomes $n = 14$ à l'extrémité de leurs racines. Le niveau de ploïdie est aussi confirmé par le compte du nombre de chloroplastes dans les cellules stomatales de garde, qui présentent 8 chloroplastes.

Abbreviations :

LSBM	Milieu de base de Linsmaier et Skoog
BAP	Purine Amino Benzyl - 6
NAA	Acide acétique naphthalène - 1
HgCl ₂	Chlorure mercurique
HCl	Acide hydrochlorique
H	Heures

INTRODUCTION

L'induction d'haploïdes *in vitro* occupe maintenant une place importante parmi les techniques disponibles de lignage des plantes. Elle offre de nouvelles possibilités pour la manipulation génétique (Lakshmisita et Ravindran, 1991). Cette technique a été largement utilisée pour les programmes d'amélioration des cultures dans plusieurs pays (Hu et Yang, 1986 ; Bajaj, 1990).

Le mûrier (*Morus* spp.) est un arbre d'une valeur inestimable et d'une importance économique considérable pour l'industrie de la soie en raison de son feuillage, qui constitue la principale nourriture du ver à soie *Bombyx mori* L. La nature très hétérozygote, vivace de la plante associée à sa période juvénile prolongée limite la vitesse d'amélioration génétique de cette culture. De plus, la nature dioïque des variétés de mûrier importantes pour ce taxon et la liaison génétique des caractères qualitatifs désirables limitent l'amélioration génétique par des techniques conventionnelles d'hybridation. De plus, chez les plantes multipliées de manière végétative comme le mûrier, il faut

* Silkworm Genetics and Breeding Laboratory, Department of Zoology, Bangalore University, Bangalore - 560 056.

plusieurs années pour mettre au point un clone aux caractères économiques et commerciaux désirables (Ravindra et coll., 1988). Les premiers haploïdes gynogéniques réussis ont été obtenus chez l'orge par San Neoum en 1976. Depuis la culture d'ovule et d'ovaire a été utilisée comme une méthode alternative à la culture d'anthère pour obtenir des plants haploïdes surtout chez les plantes où la culture d'anthère a échoué ou donné des résultats insatisfaisants (Cappadocia et Vieth, 1990).

Compte tenu de cela, nous avons essayé d'induire des plants haploïdes dans cette étude, en utilisant des ovules non pollinisés disséqués à partir d'un gynécée mis au point *in vivo* à partir du clone femelle de la variété de mûrier – S54.

MATERIELS ET METHODES

L'inflorescence non pollinisée du cultivar S54 de *Morus indica* L., un mutant populaire bénéfique portant des fleurs femelles unisexuées recueilli à la Banque génétique du mûrier du Département de Sériciculture de l'Université de Bangalore, à Bangalore a été utilisée comme matériel source.

Les branches contenant une inflorescence femelle d'une semaine sont ensachées dans des sacs en polyéthylène pour éviter la pollinisation croisée. Après 2 à 3 semaines, on retire les sacs de polyéthylène et les inflorescences femelles non pollinisées sont recueillies, lavées avec soin sous l'eau du robinet et leur surface est stérilisée en utilisant un détergent liquide (Laboline à 5 % (v/v)), rincées dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes, désinfectée dans du chlorure mercurique à 0,1 % (HgCl_2) pendant 3 minutes et rincées plusieurs fois dans de l'eau distillée pour enlever les traces d' HgCl_2 . Puis, le gynécée individuel est séparé de l'inflorescence non pollinisée et disséqué pour détacher l'unique ovule pendant. Les ovules non pollinisés disséqués sont cultivés sur du milieu de base de Linsmaier et Skoog à moitié concentré et concentré (LSBM) (1965) avec du saccharose à 3 %, 4 %, 8 % et 12 % (Tableau I). Ces cultures sont maintenues dans la pièce de culture à une température de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ avec une intensité de lumière de 3000 lux et une Humidité Relative (RH) de 55 %. On détermine la ploïdie des extrémités des racines des plants obtenus *in vitro* à partir de la culture d'ovule. Les extrémités des racines sont rincées sous l'eau du robinet et traitées avec de l'hydroxyquinoléine-8 à 0,02 % à 4°C pendant 3h. Les extrémités des racines sont fixées dans du Carnoy modifié contenant de l'alcool absolu, du chloroforme, de l'acide acétique glacial (6 : 4 : 1) pendant 24 h. Les extrémités des racines fixées sont colorées avec de l'aceto-orcéine à 2 % et écrasées. Les lames sont criblées pour confirmer le nombre de chromosomes.

On détermine le niveau de ploïdie en comptant le nombre de chloroplastes dans les cellules stomatales de garde. L'épiderme inférieur des jeunes feuilles est retiré et coloré avec une solution d'iode de Lugol qui contient de l'iodure de potassium à 2 % et une solution d'iode à 1 %. On compte le nombre de chloroplastes dans chaque cellule de garde.

Les données sont analysées de manière statistique grâce à une analyse de variance à un facteur (ANOVA) pour déterminer la variation du nombre de pousses et de racines entre et à l'intérieur des traitements.

RESULTATS

Regénération :

On a remarqué que le LSBM concentré additionné de BAP (2 mg l^{-1}) avec une concentration de saccharose à 3, 4, 8 et 12 % donne une faible réponse pour induire les primordia des pousses à partir des ovules non pollinisés (Tableau I). Cependant, on observe que le LSBM concentré + BAP (2 mg l^{-1}) + saccharose (8 %) est la concentration optimum pour induire des primordia de pousses quand on les compare à des concentrations de saccharose à 3, 4 et 12 %.

L'ovule non pollinisé (Fig. 1) donne naissance à de minuscules primordia de pousses vertes sur du LSBM à demi concentré + BAP (2 mg l^{-1}) + saccharose (8 %) après 8 semaines de culture (Figs. 2, 3 et 4) (Tableau I). Ces minuscules primordia de pousses vertes sont transférées sur du LSBM + BAP

(2 mg l⁻¹) pour la multiplication. Après 4 semaines de transfert, 10 à 12 pousses multiples se forment à partir des primordia de pousses vertes dérivées de l'ovule (Fig. 5 & 6) (Tableau II). Les pousses multiples bien développées sont mises en sous culture sur du LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) pour le racinement (Tableau III).

Après 2 semaines de sous-cultures, les plantules bien développées avec des racines (Fig. 7) sont transférées dans des pots contenant un mélange de tourbe : perlite : sable dans un rapport 50 : 25 : 25 (v/v) pour le durcissement et sont mises dans le sol avec un pourcentage de survie de 78 %.

Analyse statistique :

Les résultats obtenus dans cette étude à partir de 16 expériences indépendantes sont soumis à une analyse de variance à un facteur pour étudier la différence entre et à l'intérieur des traitements. Il s'avère que le LSBM à moitié concentré + BAP (2 mg l⁻¹) + saccharose (8 %) présente la réponse la plus élevée de 92 % et le nombre moyen le plus élevé de 0,9 pour la formation de bourgeon de pousse par explant (Tableau I). Les données révèlent que le LSBM complet + BAP (2 mg l⁻¹) et le LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + NAA (1 mg l⁻¹) est le meilleur milieu pour la formation de pousses et de racines multiples avec un nombre moyen de 9,3 et 6,8 par explant respectivement. De plus, on calcule la différence critique (DC) et on montre que sur 120 paires de traitements 43 couples, sur 15 couples de traitements, 14 couples, sur 28 couples de traitements 20 couples s'avèrent significativement différents pour respectivement les bourgeons de pousses, les pousses multiples et la formation de racine.

Cytologie :

Les plants cultivés *in vitro* à partir d'ovules non pollinisés sont analysés sur le plan cytologique. On compte les chromosomes en utilisant les extrémités de racines de chaque plant. Tous les plants présentent un nombre haploïde de chromosomes $n = 14$ (Fig. 8). Aucun des plants ne présente de nombre diploïde ($2n = 28$) de chromosomes à l'extrémité des racines.

Indice " chloroplastes " :

On détermine aussi le niveau de ploïdie en comptant le nombre de chloroplastes dans les 2 cellules de garde des stomates. Les haploïdes ont 8 chloroplastes dans les deux cellules de garde des stomates (Fig. 9) tandis que les diploïdes ont 10 à 11 chloroplastes.

DISCUSSION

Les récentes avancées de la culture de tissus de plantes ont permis l'induction réussie d'haploïdes à partir d'ovaires (Yang et Zhou, 1982 ; Truong et Demarly, 1984 ; Yi et coll., 1996) et d'ovules non pollinisés (Doctrinal et coll., 1989 ; Campion et Alloni, 1990 ; Miyoshi et Asakura, 1996 ; Tosca et coll., 1999) chez les espèces de plantes comme alternative à la culture d'anthère et elles s'avèrent prometteuses pour les programmes d'amélioration des cultures et des arbres (Prakash et Chand, 1999). Le long cycle de vie, l'hétérozygotie, la polyploïdie, la dioecie et l'outbreeding extensif sont des handicaps pour les programmes d'amélioration du mûrier. De plus, les facteurs comme la sélection des plants parents pour obtenir les ovules, de la taille optimum de l'ovule, du milieu de base et les conditions de culture influencent la réponse des ovules *in vitro* (Prakash et Chand, 1999).

Lakshmi Sita et Ravindran, (1991), Thomas et coll., (1999) et Kavyashree et coll., (2001) ont rapporté l'obtention de plants à partir de la culture du gynécée du mûrier. Cependant, jusqu'à présent on n'a pas rapporté de plants à partir de la culture d'ovules *in vitro* chez le mûrier. Dans cette étude, les cultures *in vitro* des ovules individuels non pollinisés *in vivo* du cv. S54 de *Morus indica* L. produisent de minuscules primordia de pousses vertes sur du LSBM à moitié concentré + BAP (2 mg l⁻¹) + saccharose (8 %) après 8 semaines de culture et après leur transfert sur du LSBM concentré + BAP (2 mg l⁻¹) elles produisent des pousses multiples après 12 semaines de culture. Cela confirme

les observations de Kobayashi et coll., (1993) selon lesquels une concentration de saccharose à 8 % est meilleure pour induire une réponse à partir d'un ovule pour la culture de patate douce. De plus, nos observations coïncident avec le rapport de Cagnet-Sitbon (1980) qui a rapporté qu'un ovule non fécondé ne répond en culture que quand sa taille est supérieure à la moitié de la cavité de l'ovaire. Nos résultats montrent que les conditions telles que le milieu de culture, l'absorption d'un régulateur de croissance, le pourcentage élevé de saccharose sont importants pour obtenir des plants à partir de la culture d'ovule de mûrier comme le montrent les observations de Rubery et Sheldrake (1974) et Jacobson et coll., (1961). De plus, la perméabilité de la membrane joue un rôle déterminant dans la morphogénèse d'un ovule de mûrier cultivé *in vitro* comme l'ont décrit Cousson et Tran Than Van (1981) chez *Nicotiana*.

Dans cette étude, l'analyse statistique de variance montre qu'il existe une différence très significative entre et à l'intérieur des traitements. Il s'avère que le LSBM à moitié concentré + BAP (2 mg l^{-1}) + saccharose (8 %) donne le nombre moyen de pousses de bourgeons le plus élevé avec 92 % de réponse et le LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) + NAA et le LSBM + BAP concentré (2 mg l^{-1}) + NAA (1 mg l^{-1}) s'avèrent significativement supérieurs pour la formation respectivement de pousses et de racines multiples.

Sur les 50 plants transférés dans le sol, 38 plants ont survécu (78 %). Ces 38 plants ont été analysés sur le plan cytologique. Aucun de ces plants ne s'avère diploïde ou aneuploïde et ils sont tous haploïdes avec $n=14$ chromosomes.

Ces observations sont de plus confirmées par le nombre de chloroplastes dans les cellules stomatales de garde. On trouve que chez le cv. S54, les haploïdes dérivés des ovules non pollinisés ont 8 chloroplastes dans les deux cellules de garde des stomates (chaque cellule de garde contient 4 chloroplastes). Cela confirme les observations de Yang et Yang (1995) chez le mûrier et de Doctrinal et coll., (1989) chez *Beta vulgaris*. Cela indique que l'hérédité du nombre de chloroplastes a une relation étroite avec le nombre de chromosomes comme l'ont suggéré Yang et Yang (1995).

La culture d'ovule offre potentiellement de larges possibilités pour les recherches de génétique et de lignage. Jusqu'à présent, on n'avait pas mis au point dans la pratique de plants haploïdes de *Morus* spp. à la constitution génétique consistante. Les résultats obtenus dans cette étude peuvent éventuellement amener l'obtention réussie de souches pures qui pourraient être utilisées pour le lignage de nouvelles variétés.

IN VITRO GERMINATION AND POLLEN TUBE GROWTH OF *TERMINALIA ARJUNA* AND *LAGERSTROEMIA PARVIFLORA**

**R. KUMAR, M. C. JOSHI, GARGI, S. BECK, A. GANGOPADHYAYA, A. K. SINHA
& B. R. R. P. SINHA**

Central Tasar Research and Training Institute, Nagari, Ranchi 835 303, India.

Anthesis in Terminalia arjuna and Lagerstroemia parviflora occurs between 9 to 10 a. m. during April –mid June and May- September respectively. Pollen grains are spherical and on an average measure 18 µm in T. arjuna to 33 µm in L. parviflora. Pollen grains show 80 to 95 per cent viability in both the genera. Pollen germination was maximum (40.95%) in 25 ppm of indole acetic acid in T. arjuna and 87.8 % in 1 percent sucrose in L. parviflora. The highest pollen tube elongation was recorded in 10 ppm of IAA (626.7 µm) in T. arjuna and 15 ppm of gibberellic acid in L. parviflora (212.8 µm). However, the effects of Boron, IAA and GA3 in combination with 2.5% sucrose on pollen germination and tube elongation varied in all the media used in both the genera.

Keywords: *Terminalia*, *Lagerstroemia*, Pollen tube, Germination, Hormones.

INTRODUCTION

Terminalia and *Lagerstroemia* spp. are considered to be the best primary and secondary food plants respectively for Tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. These plants are also known for their tremendous medicinal value, which is well documented in ancient Indian literature. Keeping this in view, improved strains with higher economic returns per unit area are needed. Pollen transmits the male genetic material in sexual reproduction of all higher plants. Thus, knowledge of production of functional pollen, retention of viability until its transfer to the stigma, germination and tube growth and fertilization are prerequisite for successful seed development. This will help plant breeders to accelerate their efforts in evolving improved varieties. Studies on these aspects are lacking in these genera except for the preliminary observations on floral biology in *Terminalia* spp. by Srivastav *et al.* (1993).

MATERIALS AND METHODS

Anthers were collected from fresh flowers between 9.30 to 10.30 a. m. from the trees grown in the experimental field of Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi. Pollen viability was determined by acetocarmine (1.5% w/v). Pollen germination and tube elongation was tested by hanging drop method in cavity slides. The cultures were kept in petridishes lined with moist filter paper for maintaining the humidity (between 65 to 75%). The sugar solution (sucrose) was used 1, 2.5, 5, 10 and 15 percent. Boron (as boric acid) together with 2.5% sucrose was used at 25, 50, 100 and 200 ppm. The effects of GA 3 and IAA (5, 10, 15 25 ppm) were also studied. In all the sets the

* Present communication is the part of selection and breeding programme being carried out in primary and secondary food plants of tasar silkworm at this Institute.

cultures were incubated for 24 hours, at the end of which they were observed for pollen germination and tube elongation. Four replicates were maintained for each treatment. The number of germinated and non-germinated grains was counted from 5 microscopic fields from each culture. Similarly for pollen tube growth at least 25 pollen tubes selected randomly were measured by ocular micrometer under a given magnification. All the data were analysed statistically for calculating standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

In *Terminalia arjuna* flowering starts from April and continues up to mid June. On the other hand, in *Lagerstroemia parviflora* it begins in May and persists till end of September. Anthesis occurred between 9 to 10 a. m. in both the genera.

Table I. Pollen germination and pollen tube elongation in sucrose in *T. arjuna* and *L. parviflora*.

Tableau I. Germination du pollen et allongement du tube pollinique dans du saccharose chez T. arjuna et L. parviflora.

Sucrose (%)	Parameter / Paramètre	<i>T. arjuna</i>	<i>L. parviflora</i>
<i>Saccharose (%)</i>			
1	Pollen germination (%) / Germination du pollen (%)	10.33 ± 0.84	87.8 ± 2.08
	Pollen tube length (µm) Longueur du tube pollinique (µm)	124.06 ± 2.46	13.17 ± 1.31
2.5	Pollen germination (%) / Germination du pollen (%)	24.40 ± 1.43	83.43 ± 1.86
	Pollen tube length (µm) Longueur du tube de pollen (µm)	419.50 ± 11.78	15.48 ± 1.48
5	Pollen germination (%) / Germination du pollen (%)	12.26 ± 1.25	53.72 ± 1.69
	Pollen tube length (µm) Longueur du tube pollinique (µm)	498.5 ± 7.85	14.72 ± 1.72
10	Pollen germination (%) / Germination du pollen (%)	10.73 ± 0.82	50.79 ± 1.71
	Pollen tube length (µm) Longueur du tube pollinique (µm)	314.22 ± 4.75	11.76 ± 1.37
15	Pollen germination (%) / Germination du pollen (%)	9.96 ± 0.88	29.14 ± 1.97
	Pollen tube length (µm) Longueur du tube pollinique (µm)	112.08 ± 3.63	*
Control (Distill Water) Témoin (Eau distillée)	Pollen germination (%) / Germination du pollen (%)	0	56.87 ± 2.52
	Pollen tube length / Longueur du tube pollinique (µm)	0	13.5 ± 1.50

* Pollen tube Bursting / Eclatement du tube pollinique. ± SD. Standard deviation / Ecart type.

Table II. Effect of Boron, IAA and GA3 on pollen grain germination and pollen tube growth in *T.arjuna* and *L. parviflora*

Tableau II. Effet du bore, de l'IAA et du GA3 sur la germination du grain de pollen et la croissance du tube pollinique chez *T. arjuna* et *L. parviflora*.

Boron (ppm)	Parameter / Paramètre	<i>T. arjuna</i>	<i>L. parviflora</i> (ppm)	IAA	<i>T. arjuna</i>	<i>L. parviflora</i> (ppm)	GA3	<i>T. arjuna</i>	<i>L. parviflora</i>
Bore (ppm)									
25	Pollen germination (%) <i>Germination du pollen (%)</i>	9.49 ± 1.02	74.50 ± 2.10	5	20.52 ± 0.91	11.90 ± 1.81	5	9.97 ± 1.32	50.30 ± 1.00
	Pollen tube length (µm) <i>Longueur du tube pollinique (µm)</i>	6.14 ± 1.00	27.40 ± 1.80		218.50 ± 7.43	147.50 ± 2.41		65.7 ± 1.18	53.5 ± 1.74
50	Pollen germination (%) <i>Germination du pollen (%)</i>	37.49 ± 1.63	60.00 ± 2.72	10	30.22 ± 1.07	14.33 ± 0.47	10	13.14 ± 1.10	57.50 ± 2.61
	Pollen tube length (µm) <i>Longueur du tube pollinique (µm)</i>	37.60 ± 1.20	36.80 ± 1.83		626.70 ± 15.57	100.40 ± 3.07		29.05 ± 1.68	89.1 ± 2.21
100	Pollen germination (%) <i>Germination du pollen (%)</i>	4.58 ± 0.73	30.60 ± 1.35	15	34.32 ± 1.28	50.80 ± 1.40	15	20.26 ± 1.27	43.60 ± 2.45
	Pollen tube length (µm) <i>Longueur du tube pollinique (µm)</i>	25.43 ± 1.01	40.60 ± 1.11		50.66 ± 1.26	43.10 ± 2.34		9 ± 1.41	212.80 ± 3.48
200	Pollen germination (%) <i>Germination du pollen (%)</i>	3.90 ± 0.67	20.60 ± 0.80	25	40.95 ± 1.55	75.90 ± 3.47	25	18.50 ± 1.36	44.10 ± 3.30
	Pollen tube length (µm) <i>Longueur du tube pollinique (µm)</i>	*	43.30 ± 1.61		*	27.10 ± 1.97		*	150.1 ± 5.04

* Pollen tube bursting / Eclatement du tube pollinique.
± S.D. / Ecart type.

The pollen grains are spherical and the size varies from 18 μm in *T. arjuna* to 33 μm in *L. parviflora*. Pollen viability ranged between 80-90% in *T. arjuna* to 90-95% in *L. parviflora*. The present findings differ from the earlier reported by Srivastava *et al.* (1993). According to them the size of the pollen grain in *T. arjuna* is 54 μm and 50% of the total pollen grains are hexagonal.

Table I shows the data on pollen germination and pollen tube growth in different concentrations of sucrose and distilled water in both genera. Pollen germination starts within 15 to 30 minutes in distilled water and 1% sucrose in *L. parviflora* and *T. arjuna* respectively. The highest germination (24.41%) was recorded in 2.5% sucrose in *T. arjuna* and 87.8% in *L. parviflora* in 1% sucrose. Use of sucrose gave better results in terms of germination in *L. parviflora* as compared to *T. arjuna*. However, the maximum tube elongation (498.5 μm) was recorded in 5% sucrose in *T. arjuna* as compared to 15.48 μm in *L. parviflora* in 2.5% sucrose. The optimum concentration of sucrose and time taken for initiation of pollen germination varies from species to species (Shivanna and Johri, 1989; Suzuki *et al.*, 1993).

Data on pollen germination and pollen tube growth in various concentrations of Boron, IAA & GA₃ are presented in Table II. Pollen germination was maximum (40.95%) in 25 ppm of IAA followed by 50 ppm Boron (37.49%) and 15 ppm of GA₃ (20.62%) in *T. arjuna*. Pollen germination increases with increase in concentration of IAA. However, maximum tube growth (626.7 μm) was recorded in 10 ppm of IAA. Bursting of pollen tube was observed in higher concentrations of Boron, IAA and GA₃. Similarly, in *L. parviflora* pollen germination increases with the increase in concentration of IAA and was found maximum (75.9%) in 25 ppm. Just reverse trend in pollen germination was recorded in Boron where it declines with the increase in the concentration of Boron. The optimum requirement for pollen germination in this species was found to be 10 ppm. of GA₃. Cheng and Rerkasen (1993) and Mercado Jose *et al.* (1994) have also observed that liquid medium containing 5-10% sucrose and 0.1 mM of boric acid supported a germination percentage close to 50% and best tube growth *in vitro* germination of wheat and *Capsicum annum* pollen respectively. Further, they concluded that use of sucrose gave better results in terms of germination / and tube growth than other sugars. The effects of IAA and GA₃ on pollen germination and pollen tube growth elongation seems to be independent (Pfahler *et al.*, 1982). Mc leod (1975) suggested that germination and tube elongation are two distinct processes, which differ in their sensitivity to different chemicals. These observations have been further corroborated by Ravindran and Chauhan (1986) in *Solanum spp.* and Kumar *et al.* (1990, 1993) in *Morus spp.* and *Heteropanax fragrans* respectively. Based on the above results it is concluded that the best medium for a balanced pollen germination and tube elongation is 10 ppm of IAA in *T. arjuna* and 15 ppm of GA₃ in *L. parviflora*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial assistance from National Agriculture Technology Project (Plant Biodiversity) under ICAR, New Delhi is thankfully acknowledged.

REFERENCES

- CHENG C., RERKSEN B. (1993) Effects of boron on pollen viability in wheat. Plant and Soil. 155-156(0), 313-315.
- KUMAR R., DANDIN S.B., RAVINDRAN S., JAIN A. K., JOLLY M. S. (1990) Studies in the reproductive biology of Mulberry. I. Sucrose, Boron and growth hormone requirement for pollen germination and pollen tube growth. Sericologia. 30(4), 479-484.
- KUMAR R., GARGI, PRASAD D. N. (1993). Studies on *in vitro* pollen germination and tube growth in *Heteropanax fragrans* (Araliaceae). Indian J. Seric. 32(1), 87-90.
- Mc leod A. (1975). The control of growth of tomato pollen. Ann. Bot. 39, 591-596.
- MERCADO JOSE A., RAFAEL FERNANDEZ M. QUESEDA M. A. (1994). *In vitro* germination of pepper pollen in liquid medium. Scientia Horticulture. (Amsterdam). 57(4), 273-281.

- PFAHLER P., WILCOY M., MULCANY D. L., KNAUFT D. A. (1982). *In vitro* germination and pollen tube growth of Maize (*Zea mays*) pollen × pollen source , genotype and gibberellin GA3 interactions. Acta Bot. Netherlandica. 31(1/2), 105.
- RAVINDRAN S., CHAUHAN Y.S. (1986). Studies in the reproductive biology of alkaloid yielding solanums. *In vitro* response of pollen grains of *Solanum khasianum* L. and *S. indicum* L. to plant growth hormones. Acta Bot. Indica,. 14(1), 130-134.
- SHIVANNA K.R., JOHRI B. M. (1989). *In vitro* germination and pollen tube growth. In” The Angiosperm pollen structure and Function.” Willey Eastern Limited. New Delhi. pp120.
- SRIVASTAVA P. K., PRASAD D. N., SINGH K. N. (1993). Floral biological investigations in four *Terminalia spp.* Sericologia. 33(2), 323-327.
- SUZUKI N., XINYAN W., KATAOKA I., INOU H. (1993). Effects of temperature on flowering and pollen germination in Japanese Apricot cs Nanko. Journal of Japanese Soc. For Hort. Sci. 62(3), 539-542.

GERMINATION ET CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE DE *TERMINALIA ARJUNA* ET DE *LAGERSTROEMIA PARVIFLORA* IN VITRO *

R. KUMAR, M. C. JOSHI, GARGI, S. BECK, A. GANGOPADHYAYA, A. K. SINHA & B. R. R. P. SINHA

Central Tasar Research & Training Institute, Nagari, Ranchi 835 303, Inde.

L'anthèse chez Terminalia arjuna et Lagerstroemia parviflora se produit entre 9 h et 10 h. du matin respectivement entre avril et mi-juin et entre mai et septembre. Les grains de pollen sont sphériques et mesurent en moyenne 18 µm chez T. arjuna et 33 µm chez L. parviflora. Les grains de pollen présentent une viabilité de 80 à 95 pourcent chez les deux genres. La germination du pollen est maximum (40,95 %) dans 25 ppm d'acide indole acétique chez T. arjuna et est de 87,8 % dans la saccharose à 1 % chez L. parviflora. L'allongement le plus important du tube pollinique est enregistré dans 10 ppm d'IAA (626,7 µm) chez T. arjuna et 15 ppm d'acide gibbérélique chez L. parviflora (212,8 µm). Cependant, les effets du bore, de l'IAA et du GA3 en combinaison avec 2,5 % de saccharose sur la germination du pollen et l'allongement du tube varient chez les deux genres avec tous les milieux utilisés.

INTRODUCTION

Terminalia et *Lagerstroemia* spp. sont considérés respectivement comme les meilleures plantes hôtes primaire et secondaire du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. Ces plantes sont aussi connues pour leur valeur médicinale considérable, sur laquelle on trouve une documentation abondante dans la littérature indienne ancienne. Compte tenu de cela, il est nécessaire de trouver des souches améliorées permettant des profits économiques plus élevés par unité de surface. Le pollen transmet le matériel génétique mâle pendant la reproduction sexuelle de toutes les plantes supérieures. Ainsi, pour mettre au point des graines avec succès, il est nécessaire d'avoir des connaissances sur la production du pollen fonctionnel, le maintien de la viabilité jusqu'à son transfert au stigmate, la germination et la croissance du pollen et la fécondation. Cela devrait permettre aux sélectionneurs de plantes d'accélérer leurs efforts pour mettre au point des variétés améliorées. Il n'y a pas assez d'études sur ces aspects chez ces genres sauf les observations préliminaires sur la biologie florale de *Terminalia* spp. faites par Srivastav et coll., (1993).

MATERIELS ET METHODES

Les anthères sont recueillies à partir de fleurs fraîches entre 9.30 et 10.30 du matin sur des arbres cultivés sur le terrain expérimental du *Central Tasar Research & Training Institute*, de Nagri, à Ranchi. On détermine la viabilité du pollen avec de l'acétocarmin (1,5 % p/v). On teste la germination du pollen et l'allongement du tube par la méthode de culture en gouttes pendantes dans les parois des cavités. Les cultures sont conservées dans des boîtes de petri tapissées de papier filtre humide pour maintenir l'humidité (entre 65 et 75 %). Des solutions de sucre (saccharose) de 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 et 15 pourcent sont utilisées. Le bore (comme l'acide borique) avec du saccharose à 2,5 % est utilisé à 25, 50, 100 et 200 ppm. Les effets du GA 3 (5, 10, 15, 25 ppm) et de l'IAA sont aussi étudiés. Pour tous

les lots, les cultures sont incubées pendant 24 heures, à la fin desquelles on observe la germination du pollen et l'allongement du tube. On maintient quatre répétitions pour chaque traitement. On compte le nombre de grains germés et non germés sur quatre champs microscopiques pour chaque culture. De même, pour la croissance du tube pollinique, on mesure au moins 25 tubes polliniques sélectionnés au hasard avec un micromètre oculaire sous un grossissement donné. Toutes les données sont analysées de manière statistique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chez *Terminalia arjuna*, la floraison commence à partir d'avril et continue jusqu'à la mi-juin. D'autre part, chez *Lagerstroemia parviflora*, elle commence en mai et continue jusqu'à la fin septembre. L'anthèse se produit entre 9 et 10 heures du matin chez les deux genres. Les grains de pollen sont sphériques et leur taille varie entre 18 μm chez *T. arjuna* et 33 μm chez *L. parviflora*. La viabilité du pollen est comprise entre 80 à 90 % chez *T. arjuna* et 90 à 95 % chez *L. parviflora*. Ces observations diffèrent des observations précédentes rapportées par Srivastava et coll., (1993). Selon eux la taille du grain de pollen de *T. arjuna* est de 54 μm et 50 % des grains de pollen sont hexagonaux.

Le Tableau I présente les données sur la germination du pollen et la croissance du tube pollinique à différentes concentrations de saccharose et dans l'eau distillée chez les deux genres. La germination du pollen commence au bout de 15 à 30 minutes dans de l'eau distillée et 1 % de saccharose chez respectivement *L. parviflora* et *T. arjuna*. La germination la plus élevée (24,41 %) est enregistrée dans du saccharose à 2,5 % chez *T. arjuna* et elle est de 87,8 % chez *L. parviflora* dans 1 % de saccharose. L'utilisation de saccharose donne de meilleurs résultats en terme de germination chez *L. parviflora* par comparaison à *T. arjuna*. Cependant, l'allongement maximum du tube (498,5 μm) est obtenu dans du saccharose à 5 % chez *T. arjuna* alors qu'il est de 15,48 μm chez *L. parviflora* dans du saccharose à 2,5 %. La concentration optimum en saccharose et le temps nécessaire au commencement de la germination du pollen varient d'une espèce à l'autre (Shivanna et Johri, 1989 ; Suzuki et coll., 1993).

Les données sur la germination du pollen et la croissance du tube pollinique avec des concentrations variées en bore, en IAA et en GA₃ sont présentées dans le Tableau II. La germination du pollen est maximum (40,95 %) dans 25 ppm d'IAA suivie par 50 ppm de bore (37,49 %) et 15 ppm de GA₃ (20,62 %) chez *T. arjuna*. La germination du pollen augmente avec l'augmentation de la concentration en IAA. Cependant, la croissance maximum du tube pollinique (626,7 μm) est enregistrée dans 10 ppm d'IAA. On observe un éclatement du tube pollinique aux concentrations les plus élevées de bore, d'IAA et de GA₃ chez *T. arjuna*. De même, chez *L. parviflora* la germination du pollen augmente avec l'augmentation de la concentration en IAA et s'avère maximum (75,9 %) dans 25 ppm. On enregistre la tendance inverse pour la germination du pollen avec le bore où elle baisse avec l'augmentation de la concentration en bore. Chez cette espèce le besoin optimum pour la germination du pollen est de 10 ppm de GA₃. Cheng et Rerkasan (1993) et Mercado Jose et coll., (1994) ont aussi observé que le milieu liquide contenant 5 à 10 % de saccharose et 0,1 mM d'acide borique donne un pourcentage de germination proche de 50 % et la meilleure germination *in vitro* pour la croissance du tube du blé et du pollen de *Capsicum annuum* respectivement. De plus, ils ont conclu que l'utilisation de saccharose donne les meilleurs résultats en termes de germination et de croissance du tube comparé aux autres sucres. Les effets de l'IAA et du GA₃ sur la germination du pollen et l'allongement du tube pollinique semblent être indépendants (Pfahler et coll., 1982). Mc leod (1975) a suggéré que la germination et l'allongement du tube sont deux processus distincts qui diffèrent de par leur sensibilité à différents produits chimiques. Ces observations ont été corroborées par Ravindran et Chauhan (1986) chez *Solanum* spp. et Kumar et coll., (1990, 1993) chez *Morus* spp. et *Heteropanax fragrans* respectivement. D'après nos résultats, nous concluons que le meilleur milieu pour une germination équilibrée du pollen et l'allongement du tube pollinique contient 10 ppm d'IAA chez *T. arjuna* et 15 ppm de GA₃ chez *L. parviflora*.

EFFECT OF LYNESTRENOL® ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF THE MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

ANUPA NASRIN KHAN, ATAUR RAHMAN KHAN* & SAIDUR RAHMAN

Department of Zoology & M. ASHIK MOSSADIK, Department of Pharmacy, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh.

The present paper reports the results of dietary administration of the vertebrate female sex hormone, Lynestrenol® on the silkworm, Bombyx mori. This hormone increased the larval weight. The female pupal and adult weights and cocoon and shell weights were significantly increased. The larval and pupal periods were significantly reduced. The oviposition was enhanced at lower concentrations but the highest concentration (400 ppm) reduced the parameter. The hatchability of the eggs was drastically reduced with all the treatments. However, it produced deleterious effects on the male silkworms.

Keywords: Vertebrate female sex-hormone, Lynestrenol®, *Bombyx mori*, growth, development.

INTRODUCTION

The use of vertebrate hormones for enhancing the commercial characters of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. has received much interest. The administration of cyclic AMP and prostaglandin E on fifth instar silkworm, *B. mori* larvae resulted in enhanced pupal and cocoon weights (Singh and Datta, 1980). A topical application of prolactin on *B. mori* larvae accelerated the growth and oviposition (Bhaskar *et al.*, 1983). Bharathi *et al.* (1983, 1986) noted enhanced larval growth, early pupation and increased cocoon weight following a pituitary extract treatment. Prostaglandin F₂ seemed to increase silk yield in *B. mori* (Bharathi and Govindappa, 1987).

Venkata Rami Reddy *et al.* (1994) for the first time identified the titers of vertebrate steroid like immunoreactive substances i.e., testosterone, estradiol-17 β and progesterone in the haemolymph of *B. mori*. These authors opined that steroids in the silkworm might have some functions for the tissue biosynthetic activities. Recently, Yun-gen (2000a & b) determined the effects of moulting and anti-juvenile hormones on *B. mori*.

The present investigation reports the effects of the vertebrate sex-hormone, Lynestrenol®, on *B. mori*.

MATERIALS AND METHODS

The high yielding multivoltine breed, BSRI 83/2 of *B. mori* was used in the present experiment. Eggs were collected from mated females and incubated. Newly hatched larvae were reared on finely chopped white mulberry leaves (*Morus alba* L.) up to the second instar.

* Corresponding author

Lynestrenol® is a white, odourless, tasteless, crystalline powder. It has actions and uses similar to these of norethisterone. It is used mainly for contraception and is given by mouth in dose of 2.5 mg in conjunction with an oestrogen such as ethinyloestradiol. It is 19-nor-17 α -pregn-4-en-20-yn-17 β -ol. Like progesterone, it has the ability to suppress ovulation for which it has found an application as an oral contraceptive. Various concentrations of the hormone were prepared by mixing it with distilled water. Silkworms were reared on the mulberry leaves dipped in these suspensions from the first day of their third instar till the end of the feeding period. Three replicates, each with 100 larvae, were utilized for each treatment. Water-treated control larvae were identically maintained.

Observations were made on the weight of larvae, pupae and adults; cocoon characters like cocoon and shell weights, and shell ratio (%); developmental periods; and fecundity and egg-viability. The growth indices were computed following Joshi (1985), Prasad and Bhattacharya (1975) and Desmukh *et al.* (1977).

The investigation was performed at $30 \pm 2^\circ \text{C}$ and $76.0 \pm 6.0\% \text{RH}$.

RESULTS AND DISCUSSION

The larval weight of *B. mori* was significantly increased after the treatment with the hormone (Table I). It was interesting to note that hormone treatments significantly reduced the male pupal and adult weights but they significantly increased female pupal and adult weights.

Table I. Effect of Lynestrenol® on the weight of *B. mori* (N = 39).

Tableau I. Effet du Lynestrenol® sur le poids de *B. mori* (N = 39).

Concentration (ppm)	Weight (mg)		
	Larvae Mean $\pm$ SD	Pupae Mean $\pm$ SD	Adults Mean $\pm$ SD
	<i>Poids (mg)</i>		
	<i>Larves</i> Moyenne $\pm$ Ecart type	<i>Nymphes</i> Moyenne $\pm$ Ecart type	<i>Adultes</i> Moyenne $\pm$ Ecart type
0 (control / témoin)	1812.85 $\pm$ 120.16	882.16 $\pm$ 63.87 (781.00 $\pm$ 42.43) ¹	532.82 $\pm$ 74.32 (309.41 $\pm$ 49.95) ¹
100	1854.79 $\pm$ 124.41	891.90 $\pm$ 78.46 (744.72 $\pm$ 60.09)	569.62 $\pm$ 63.53 (290.36 $\pm$ 46.48)
200	1870.69 $\pm$ 130.18	942.214 $\pm$ 59.75 (683.03 $\pm$ 58.74)	599.77 $\pm$ 60.39 (289.56 $\pm$ 45.97)
300	1903.21 $\pm$ 116.04	952.62 $\pm$ 51.64 (679.36 $\pm$ 69.66)	623.10 $\pm$ 47.31 (279.00 $\pm$ 46.80)
400	1921.31 $\pm$ 127.77	1016.10 $\pm$ 88.09 (654.39 $\pm$ 79.13)	696.69 $\pm$ 50.41 (268.15 $\pm$ 41.85)
F ² ratio	4.58 (P < 0.001)	25.99 (P < 0.001) (27.07) (P < 0.001)	5.58 (P < 0.001) (4.27) (P < 0.001)

SD: Standard deviation / *Ecart type*. ² Variance ratio / *Ratio de variance*. ¹ Figures in parentheses show corresponding values in males. / *Les chiffres entre parenthèses montrent les valeurs correspondantes chez les mâles.*

Table II. Effect of Lynestrenol® on the cocoon characters of *B. mori* (N = 39).Tableau II. Effet du Lynestrenol® sur les caractères du cocon de *B. mori* (N = 39).

Concentration (ppm)	Character / Caractère		
	Cocoon weight (mg) Mean ± SD	Shell weight (mg) Mean ± SD	Shell ratio (%) Mean ± SD
	Poids du cocon (mg) Moyenne ± Ecart type	Poids de la coque (mg) Moyenne ± Ecart type	Richesse soyeuse (%) Moyenne ± Ecart type
0 (control / témoin)	996.13 ± 61.98 (915.05 ± 49.60) ¹	113.56 ± 13.94 (131.36 ± 13.06) ¹	11.45 ± 1.62 (14.35 ± 1.15)*
100	1019.15 ± 78.58 (874.74 ± 70.88)	127.26 ± 15.55 (129.77 ± 14.03)	12.55 ± 1.68 (14.83 ± 0.98)
200	1070.21 ± 65.07 (800.72 ± 69.50)	128.00 ± 16.85 (117.69 ± 14.00)	11.96 ± 1.40 (15.11 ± 3.19)
300	1094.03 ± 53.85 (789.92 ± 80.04)	141.41 ± 16.13 (114.28 ± 13.72)	12.94 ± 1.43 (14.47 ± 0.94)
400	1168.18 ± 89.64 (767.81 ± 84.11)	152.08 ± 12.43 (114.31 ± 12.91)	13.08 ± 1.31 (14.91 ± 2.17)
F ² -ratio	37.302 (P < 0.001) (26.01) (P < 0.001)	31.557 (P < 0.001) (14.54) (P < 0.001)	6.592 (P < 0.001) (1.18) (NS)

SD : Standard deviation / Ecart type. ¹ Figures in parentheses show corresponding values in males. / Les chiffres entre parenthèses montrent les valeurs correspondantes chez les mâles. * Variance ratio / Ratio de variance.

Administration of Lynestrenol® enhanced cocoon characters in *B. mori* (Table II). Treatments with hormone significantly reduced the male cocoon and shell weights and the administration of hormone produced no significant effect on the male shell ratio (%).

Hormone supplementation significantly decreased the larval and pupal durations in *B. mori* (Table III). The lowest and highest developmental periods were recorded at 100 ppm and 0 (control) respectively.

The oviposition by *B. mori* females was slightly enhanced at 100 ppm but it was reduced gradually up to 400 ppm (Table IV). The hatchability of the eggs laid by the female moths resulting from the treated groups was drastically reduced and the effect was dose-dependent (Table IV). At the highest concentration (400 ppm) the egg-viability (%) was the lowest.

Various growth indices of *B. mori* following treatments with Lynestrenol® have been presented in Table V. A perusal of the data shows that the hormone enhanced the growth indices in the silkworm.

Saha and Khan (1997) identified the effects of dietary administration of the vertebrate sex-hormones, ethynyl estradiol and norethindrone, on the silkworm *B. mori*. These hormones increased the larval weight, female pupal and adult weights and cocoon shell weights were also significantly increased.

Table III. Effect of Lynestrenol® on the development periods (days).

Tableau III. Effet du Lynestrenol® sur les durées de développement (jours).

Concentration (ppm)	Larval period		Pupal period		Total Developmental Period
	Mean $\pm$ SD	No. of larvae	Mean $\pm$ SD	No. of pupae	
	<i>Période larvaire</i>		<i>Période nymphale</i>		
	<i>Moyenne ± Ecart type</i>	<i>Nbre de larves</i>	<i>Moyenne ± Ecart type</i>	<i>Nbre de nymphes</i>	<i>Durée de développement totale</i>
0 (control / témoin)	19.28 $\pm$ 0.75	278	10.79 $\pm$ 0.53	270	30.66
100	17.74 $\pm$ 0.79	260	9.35 $\pm$ 0.63	252	27.09
200	17.77 $\pm$ 0.97	268	9.48 $\pm$ 0.74	258	27.25
300	17.94 $\pm$ 0.88	250	9.77 $\pm$ 0.79	238	27.71
400	18.72 $\pm$ 0.65	252	10.67 $\pm$ 0.52	224	29.37

SD: Standard deviation / *Ecart type*.Table IV. Effect of Lynestrenol® on the reproductive potential of *B. mori*.Tableau IV. Effet du Lynestrenol® sur le potentiel reproductif de *B. mori*.

Concentration (ppm)	Fecundity Mean $\pm$ SD	No. of females	Hatchability Mean $\pm$ SD	No. of eggs sampled
	<i>Fécondité Moyenne $\pm$ Ecart type</i>	<i>Nbre de femelles</i>	<i>Eclosion Moyenne $\pm$ Ecart type (%)</i>	<i>Nbre d'œufs échantillonnés</i>
0 (control / témoin)	430.69 $\pm$ 30.62	39	96.74 $\pm$ 3.58	16797
100	436.56 $\pm$ 36.83	39	85.39 $\pm$ 1.38	17026
200	405.87 $\pm$ 52.67	39	78.02 $\pm$ 12.86	15829
300	390.92 $\pm$ 81.65	39	76.74 $\pm$ 8.22	15246
400	376.41 $\pm$ 69.40	39	71.27 $\pm$ 5.09	14680
F ² -ratio	7.73 (P < 0.001)		68.91 (P < 0.001)	

SD : Standard deviation / *Ecart type*. ² Variance ratio / *Ratio de variance*.

Table V. Effect of Lynestreneol® on the growth indices of *B. mori*.Tableau V. Effet du Lynestreneol® sur les indices de croissance de *B. mori*.

Growth index	Concentration of Lynestreneol® (ppm)				
	Control	100	200	300	400
<i>Indice de croissance</i>	<i>Concentration en Lynestreneol® (ppm)</i>				
	<i>Témoin</i>	<i>100</i>	<i>200</i>	<i>300</i>	<i>400</i>
Larval weight index <i>Indice de poids larvaire</i>	1	1.023	1.031	1.049	1.059
Pupal weight index <i>Indice de poids nymphal</i>	1 (1)	1.010 (0.953) ¹	1.067 (0.879)	1.079 (0.861)	1.151 (0.838)
Adult weight index <i>Indice de poids adulte</i>	1 (1)	1.069 (0.938)	1.126 (0.935)	1.169 (0.901)	1.308 (0.867)
Larval-pupal index <i>Indice larvo-nymphal</i>	1	0.884	0.889	0.904	0.958
Silk index / <i>Indice soyeux</i>	1 (1)	1.140 (0.988)	1.135 (0.896)	1.253 (0.861)	1.353 (0.870)
Oviposition index / <i>Indice de ponte</i>	1	1.014	0.942	0.908	0.874

SD : Standard deviation / *Ecart type*. NS : Not significant / *Non significatif*.

¹ Figures in parentheses show corresponding values in males. / *Les chiffres entre parenthèses présentent les valeurs correspondantes chez les mâles.*

A survey of the data clearly indicates that vertebrate sex-hormones have significant effects on the growth and development of *B. mori*. Unfortunately, the mode of action of the hormone has yet to be elucidated in the silkworm. Future more comprehensive works are very much to be solicited in this line and it is very much to be expected that Lynestreneol® will produce positive effects on the economic parameters of the silkworm.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to extend sincere thanks to the Chairman, Department of Zoology, Rajshahi University, for providing necessary laboratory facilities.

REFERENCES

- BHARATHI D. & GOVINDAPPA S. 1987. Effect of prostaglandin F₂ on the growth pattern of silkworm larvae of *Bombyx mori* L. *Sericologia* 27: 355-358.

- BHARATHI D., BHASKAR M., REDDANA P. & GOVINDAPPA S. 1983. An attempt to improve the organic constituents in the body of silkworm larvae, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 24: 473-497.
- BHASKAR M., BHARATHI D., REDDANNA P. & GOVINDAPPA S. 1983. Growth pattern of silkworm larvae, *Bombyx mori* L. on exposure to prolactin. *Indian J. Seric.*, 21-22: 33-35.
- BHARATHI D., BHASKAR M., REDDANA P. & GOVINDAPPA S. 1986. Effect of vertebrate pituitary extract administration on the organic constituents of the silkworm larvae, *Bombyx mori* L. *Indian J. Comp. Anim. Physiol.*, 4: 9-12.
- DESMUKH P. D., RATHORE Y. S. & BHATTACHARYA A. K. 1977. Studies on growth and development of *Diacrisia obliqua* (Lep.: Arctiidae) on sixteen plant species. *Z. Ang. Ent.*, 84: 431-435.
- JOSHI K. L. 1985. Studies on the growth index of Eri silkmoth, *Philosomia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). *Sericologia*, 25(3): 313-319.
- KHAN A. R. & SAHA B. N. 1997. Effect of vertebrate sex-hormones, mestranol and norethindrone, on growth and development of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Bangladesh J. Zool.* 25(2): 103-109.
- PRASAD J. & BHATTACHARYA A. K. 1975. Growth and development of *Spodoptera littoralis* (Lep.: Noctuidae) on several plants. *Z. Ang. Ent.*, 79: 34-48.
- SINGH B. D. & DATTA S. 1980 Effect of cyclic AMP (c-AMP) and prostaglandin on post embryonic development of silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Entomol.*, 42: 197-201.
- VENKATA RAMY REDDY K., MAGADUM S. B., MEERA V. & DATTA R. K. 1994. Metabolic significance of vertebrate type steroids in silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 33(1): 6-11.
- YUNGEN MIAO 2000a. Effect of moulting hormone on the larval growth, cocoon characters and silk quality of the silkworm. *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 40(1): 135-143.
- YUNGEN, MIAO 2000b. Effect of Jinlu, an anti-juvenile hormone on the cocoon production of silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 40(3): 349-356.

EFFET DU LYNESTRENOL® SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DU VER A SOIE DU MURIER, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

ANUPA NASRIN KHAN, ATAUR RAHMAN KHAN* & SAIDUR RAHMAN

Department of Zoology & M. ASHIK MOSSADIK, Department of Pharmacy, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh.

Cet article rapporte les résultats de l'administration dans le régime alimentaire du ver à soie, Bombyx mori L. de l'hormone sexuelle femelle de vertébrés, le Lynestrénol®. Cette hormone augmente le poids larvaire. Les poids des nymphes et adultes femelles et les poids du cocon et de la coque augmentent de manière significative. Les durées larvaire et nymphale diminuent de manière significative. Cela améliore la ponte aux concentrations les plus faibles mais la concentration la plus élevée (400 ppm) réduit ce paramètre. L'éclosion des œufs décroît de manière radicale avec tous les traitements. L'hormone produit des effets néfastes chez les vers à soie mâles.

INTRODUCTION

L'utilisation d'hormones de vertébrés pour améliorer les caractères commerciaux du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. a reçu beaucoup d'intérêt. L'administration d'AMP cyclique et de prostaglandine E chez les larves du ver à soie *B. mori* du 5^{ème} âge améliore les poids de la nymphe et du cocon (Singh et Datta, 1980). L'application topique de prolactine chez les larves de *B. mori* accélère la croissance et la ponte (Bhaskar et coll., 1983). Bharati et coll., (1983, 1986) ont remarqué une croissance larvaire améliorée, une nymphose précoce et l'augmentation du poids du cocon suite à un traitement avec un extrait d'hypophyse. La prostaglandine F2 semble améliorer le rendement en soie chez *B. mori* (Bharathi et Govindappa, 1987).

Venkata Rami Reddy et coll., (1994) ont pour la première fois identifié des stéroïdes de vertébrés comme les substances immunoréactives telles que la testostérone, l'estradiol-17β et la progestérone dans l'hémolymphe de *B. mori*.

Ces auteurs pensent que les stéroïdes chez le ver à soie pourraient avoir des fonctions dans les activités biosynthétiques des tissus. Récemment, Yun-gen (2000a & b) a déterminé les effets de l'hormone de mue et des hormones anti-juvéniles chez *B. mori*.

Cette étude rapporte les effets de l'hormone sexuelle de vertébré, le Lynestrenol ® chez *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

La lignée polyvoltine à rendement élevé, BSRI 83/2 de *B. mori* a été utilisée dans cette expérience. Les œufs sont recueillis auprès de femelles s'étant accouplées et sont incubés. Les larves venant d'éclore sont élevées sur des feuilles de mûrier blanc hachées (*Morus alba* L.) jusqu'au deuxième âge.

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

Le lynestrenol® est une poudre blanche, sans odeur, sans goût, cristalline. Elle a des actions et des usages similaires à celles de la norethisterone. Elle est principalement utilisée pour la contraception et est administrée oralement en dose de 2.5 mg en conjonction avec un œstrogène tel que l'éthinylestradiol. Sa composition est 19-nor-17 α -pregn-4-en-20-yn-17 β -ol. Comme la progestérone, elle peut supprimer l'ovulation et a trouvé une application comme contraceptif oral. On prépare des concentrations variées d'hormone en la mélangeant avec de l'eau distillée. Les vers à soie sont élevés sur les feuilles de mûrier plongées dans ces suspensions à partir du 1^{er} jour du troisième âge jusqu'à la fin de la période de nourrissage. Trois répétitions, chacune de 100 larves, sont utilisées pour chaque traitement. Les larves témoins traitées à l'eau sont maintenues de manière identique.

On fait des observations sur le poids des larves, des nymphes et des adultes ; les caractères des cocons comme les poids du cocon et de la coque et la richesse soyeuse (%) ; les périodes de développement et la fécondité et la viabilité des œufs. Les indices de croissance sont calculés selon Joshi (1985), Prasad et Bhattacharya (1975) et Desmukh et coll., (1977).

L'étude est menée à $30 \pm 2^\circ \text{C}$ et $76 \pm 6\%$ d'HR.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le poids larvaire de *B. mori* augmente de manière significative après le traitement avec l'hormone (Tableau I). Il est intéressant de noter que les traitements hormonaux baissent de manière significative le poids de la nymphe et de l'adulte mâles mais ils augmentent de manière significative le poids de la nymphe et de l'adulte femelle.

L'administration de Lynestrenol améliore les caractères du cocon chez *B. mori* (Tableau II). Les traitements avec l'hormone font baisser les poids du cocon et de la coque mâles de manière significative et n'ont pas d'effet significatif sur la richesse soyeuse mâle (%).

L'ajout d'hormone fait baisser les durées larvaire et nymphale chez *B. mori* de manière significative (Tableau III). Les durées de développement les plus courtes et les plus longues sont enregistrées respectivement avec 100 ppm et 0 (témoin).

La ponte des femelles *B. mori* est légèrement améliorée à 100 ppm mais elle baisse progressivement jusqu'à 400 ppm (Tableau IV). L'éclosion des œufs pondus par les papillons femelles venant des groupes traités baisse de manière radicale et l'effet dépend de la dose (Tableau IV). A la concentration la plus élevée (400 ppm) la viabilité des œufs est la plus faible.

Les indices de croissance variés de *B. mori* suivant les traitements avec du Lynestrenol® sont présentés dans le Tableau V. L'observation des données montre que l'hormone améliore les indices de croissance du ver à soie.

Saha et Khan (1997) ont identifié les effets de l'administration alimentaire d'hormones sexuelles de vertébrés, l'éthinyl estradiol et le norethindrone, chez le ver à soie *B. mori*. Ces hormones augmentent le poids de la larve, les poids de la nymphe et de l'adulte femelles ainsi que les poids de la coque soyeuse.

L'observation des résultats indique clairement que les hormones sexuelles de vertébrés ont des effets significatifs sur la croissance et le développement de *B. mori*. Malheureusement, on n'a pas encore élucidé le mode d'action de l'hormone chez le ver à soie. De nombreux travaux plus détaillés sont nécessaires dans cette direction et on peut fortement penser que le Lynestrenol® aura des effets positifs sur les paramètres économiques du ver à soie.

EFFECT OF REFRIGERATION ON THE HATCHABILITY OF DIFFERENT AGES OF OAK TASAR SILKWORM EGGS

BIREN RANA, REETA LUIKHAM, M.V. CHALAPATHY, Y. DEBARAJ, N. IBOHAL SINGH, R.K. SINHA & K. THANGAVELU

Regional Tasar Research Station, Central Silk Board, Mantripukhri, Imphal - 795 002 Manipur, India

*Effect of refrigeration on the hatchability of **Antheraea proylei** eggs was studied to determine the suitable age of eggs, temperature and duration for refrigeration in order to delay hatching. 24, 48, & 72 hours old eggs were subjected to cold storage at 0, 5, 10 & 15° C for a period of 5-35 days, then incubated at 24 ± 2° C and the hatching was recorded. Observation of eggs at 0° C revealed maximum adverse effect on the hatchability of 24 h. old eggs with all durations of storage while at 15° C, irregular hatching started beyond 15 days of refrigeration period. The average hatching in eggs of all ages was highest at 10° C with more than 60% hatching upto a period of 20 days and declined thereafter. The age of eggs and the period of refrigeration at four different temperatures were observed to have a significant effect on the percentage of hatching.*

Keywords: Grainage span, Blastokinesis, Refrigeration, Incubation, Hatching, Leaf sprouting.

INTRODUCTION

Emergence of moths and prolonged grainage span during spring lead to considerable loss of disease free layings in oak Tasar silkworm. The non-diapausing eggs generally hatch-out between 9th to 11th day after pairing (Jolly *et al.*, 1975). In the commercial grainage, it becomes necessary to evolve some techniques to postpone hatching for synchronising with leaf sprouting, late and bulk distribution of layings etc. (Datta *et al.*, 1972). Considerable information is available on the refrigeration of eggs in other silkworms (Datta *et al.*, 1972; Sakaguchi, 1978; Chaudhuri *et al.*, 1987; Nangia & Nagesh Chandra, 1988; Kumar & Thangavelu, 1993). However, there are a few works on the oak tasar silkworm and they are contradictory (Ibohal *et al.*, 1987 & Pandey *et al.*, 1992). The present work is therefore, undertaken to ascertain the suitable age, temperature and duration for refrigeration of eggs with minimum adverse effect on hatching.

MATERIALS & METHODS

Eggs laid on the 1st, 2nd & 3rd day by a fix number of fertilized female moths were collected simultaneously during spring crop grainage following the collection procedure. Eggs were mixed together and refrigerated 24, 48 & 72 h. after oviposition at 0 ± 1, 5 ± 1, 10 ± 1 & 15 ± 1° C for a period of 5-35 days at an interval of 5 days each. 300 eggs under 3 replications of 100 each were taken for each set of temperature, age of eggs and duration of refrigeration. After a scheduled storage, eggs were released through intermediate temperatures and incubated at 24 ± 2° C. Percentage of hatching was calculated by taking hatching for consecutive 3 days. A control set was maintained separately without cold treatment. Data were statistically analysed using analysis of variance.

Table I. Effect of refrigeration on hatchability of *Antheraea proylei* eggs.Tableau I. Effet de la réfrigération sur l'éclosion des oeufs d'*Antheraea proylei*.

Temperature	Age of egg	Duration of refrigeration (days)								C. D. at		
(°C)	Age de l'oeuf (Hrs.)	Durée de réfrigération (jours)										
		5	10	15	20	25	30	35	C*	Mean Moyenne	5%	1%
0	24	46.0	32.7	24.3	24.0	12.0	8.0	6.3	70.0	27.19	4.69	6.50
	48	62.7	57.0	59.0	56.7	47.0	41.3	37.3	70.0	53.88	8.94	12.40
	72	62.0	55.0	56.3	53.0	43.7	34.7	31.0	70.0	50.71	9.09	12.61
5	24	64.7	63.7	63.3	59.0	52.3	35.0	18.7	70.0	53.24	9.84	13.65
	48	70.0	67.3	62.3	61.7	55.0	41.0	28.7	70.0	57.00	11.38	15.76
	72	67.7	66.3	63.0	60.0	52.3	38.0	28.3	70.0	55.70	10.54	14.60
10	24	71.7	70.3	68.0	66.3	58.3	51.7	37.3	70.0	61.70	10.82	14.99
	48	70.0	67.3	69.7	63.0	56.7	48.3	35.7	70.0	60.09	12.14	16.84
	72	66.7	64.3	63.7	61.3	56.0	46.3	31.0	70.0	57.41	11.62	16.09
15	24	48.7	47.7	46.7	42.3	35.7	30.0	22.7	70.0	42.98	8.47	11.74
	48	57.0	60.3	57.0	53.0	51.7	42.3	40.0	70.0	53.91	8.49	11.70
	72	54.0	50.0	56.0	53.7	51.0	46.7	44.7	70.0	56.26	2.15	8.61

* C = Control / Témoin. C. D. Critical difference / Différence critique.

RESULTS & DISCUSSION

The data presented in Table I showed a range of hatching from 71.7% in 24 h. old eggs (10° C, 5 days) to 6.3% in eggs of the same age (0° C, 35 days). The mean hatching percentage in 24, 48 & 72 h. old eggs was found to be highest at 10° C (61.7, 60.1 & 57.4), followed by 5° C (53.3, 57.0 & 55.7), 15° C (43.0, 53.9 & 53.3) and 0° C (27.9, 53.9 & 50.7). With the advancement of refrigeration period, hatching declined in eggs of all ages irrespective of temperatures at which they were refrigerated. Results of Anova at different temperatures indicated highly significant effect of age and length of refrigeration on hatching of *A. proylei* eggs.

Howe (1967) reported that the 1st stage of embryonic development of insect eggs is very crucial, they are sensitive to low temperature, but older eggs become progressively more resistant to low temperature (Walters, 1967).

In *P. ricini* (Narashimhanna, 1967) and *B. mori* (Sakaguchi, 1978), blastokinesis takes place on the 4th & 5th day of incubation during which it may survive the exposure to a particular lethal temperature as suggested by Andrewarthe & Birch (1954) in general.

Pandey *et al* (1992) have also observed the sensitivity of *A. proylei* eggs to low temperature (5 ± 2° C) up to the formation of blastokinesis which is reported to take place within the 1st day of oviposition. While Nangia & Nageshchandra (1988) recorded good hatching in the eggs of *Samia cynthia ricini* (laid within 72 h.) upto a period of 15 days when refrigerated at 0° C.

In the present investigation, refrigeration at 0 & 15° C had maximum adverse effect on 24 h old eggs where less than 50% hatching was observed with all durations of storage.

At 5° C, more than 60% hatching was observed in 24 h. old eggs upto a period of 15 days and the same in 48 & 72 h. old eggs was observed upto a period of 20 days. While at 10° C, hatching was above 60% for eggs of all ages upto 20 days and declined thereafter. Our finding is contrary to the findings of Pandey *et al.* (1992) who reported that from 2nd day onwards, the eggs of *A. proylei* develop resistance to cold (5 ± 2° C) upto 40 days with less than 10% loss. With the increase in age of eggs from 24 h. to 48 h., mean hatching percentage increased at 0° C while it decreased from 24 h. to 72 h. at 10° C. Datta *et al* (1972) also observed an increase in the percentage of mortality in *B. mori* with an increase in the eggs' age when exposed to low temperature of 5-7° C and reported that 36 h. old eggs are more suitable for long term preservation as compared to older eggs for getting maximum hatching. Vishwakarma (1982-83) observed that at 7 ± 2° C, 3 days old eggs of *P. ricini* in summer and 5 days old eggs in winter are more resistant to cold than at 3 ± 1° C (Govindan *et al*, 1980) where refrigeration beyond 5 days of age has an adverse effect on hatching.

Refrigeration at 15° C had little impact in postponement of hatching for eggs of all ages and they exhibited poor & irregular hatching beyond 15 days of refrigeration which might be due to unarrested development of embryo. Nangia & Nageshchandra (1988) also made similar observations for the eggs of *Samia cynthia ricini* refrigerated at 15° C and reported that storage of eggs at 5-10° C for 5-10 days gives the highest effective rate of rearing (ERR). Thus, it is concluded that eggs of all 3 ages can be stored safely at 5-10° C for a duration of 15-20 days without an adverse effect on hatching in *Antheraea proylei*.

REFERENCES

- ANDREWARTHE, H.G. & BIRCH, L.C. (1954) The distribution and abundance of Animals, 1st Edition, the University of Chicago press, U.S.A.
 CHAUDHURI C. C., DUBEY O.P., CHAUDHURI A. & SENGUPTA K. (1987) Effect of refrigeration on the preservation of muga cocoons. *Antheraea assamensis*, XVth International Sericultural Congress, Thailand pp 122-127.
 DATTA R.K., SENGUPTA K. & BISWAS S.N. (1972) Studies on the refrigeration of multivoltine silkworm eggs at low temperatures. Indian J. Seric., 11, 20-27.

- GOVINDAN R., DEVAIAH M.C., RANGASWAMY H.R. & THIPPESWAMY C. (1980) Effect of refrigeration of the eggs of Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval on hatching Indian J. Seric. 19, 13-15.
- HOWE R.H. (1967) The temperature effects on embryonic development in insects, 12: 15-42. In "Annual Review of Entomology" Ed. Smith, R.F. & Mittler, E; Annual Review INC, U.S.A.
- JOLLY M.S., CHAUDHURY S.N. & SEN S.K. (1975) Non-mulberry Sericulture in India, Central Silk Board, Ambica Publishers.
- KUMAR N. & THANGAVELU K. (1993) Strategies in egg protection in tasar culture. Indian Silk, 32(4).
- NARASIMHANNA M.N. (1967); Indian J. Seric. (3), 13-16.
- NANGIA N. & NAGESH CHANDRA B.K. (1988) On the effect of low temperature on egg hatch & subsequent development of *Samia cynthia ricini* Biosduval (Lep.: Sat.). Sericologia, 28(3): 337-341.
- PANDEY R.K., LUIKHAM R., DAS P.K. & NOAMANI M.K.R. (1992) Effect of cold storage on the hatchability of Oak Tasar Silkworm. Indian Silk, 31. (2) 45-46.
- SAKAGUCHI, B. (1978) In : The silkworm, an important laboratory tool, Kodansha, Tokyo.
- SINGH N.I., NIGAM M.P., GUPTA R., DHASMANA M.M. & DAS, P.K. (1987) Preliminary studies on effect of refrigeration of *Antheraea proylei* J. eggs (Lep.; Sat.) on hatching & other economic characters. In Proc. Natn. Semin. Seric. (Ed. Mahalingam), Vellore pp. 271-273.
- VISHWAKARMA S.R. (1982-83) Effect of refrigeration of Eri silkworm, *Philosamia ricini* Hutt eggs on the hatching (Lep. Sat.). Indian J. Seric. 36-39.
- WALTERS F.L. (1967) Effect of temperature on hatching & development of *Tribolium confusum*. J. Stored Products. Referred to in Howe, R.H., Annual Review of Entomology, 12: 15-42.

EFFET DE LA REFRIGERATION SUR L'ECLOSION DES ŒUFS DU VER A SOIE TASAR DU CHENE A DIFFERENTS AGES

BIREN RANA, REETA LUIKHAM, M. V. CHALAPATHY, Y. DEBARAJ, N. IBOHAL
SINGH, R. K. SINHA & K. THANGAVELU

Regional Tasar Research Station, Central Silk Board, Mantripukhri, Imphal – 795 002 Manipur,
Inde.

*Nous avons étudié l'effet de la réfrigération sur l'éclosion des œufs d'**Antheraea proylei** pour déterminer l'âge des œufs, la température et la durée de réfrigération adaptés à un retardement de l'éclosion. Des œufs âgés de 24, 48 et 72 h sont soumis à un stockage au froid à 0, 5 ; 10 et 15° C pendant une période de 5 à 35 jours, puis sont incubés à 24 ± 2° C. L'observation des œufs à 0° C révèle un effet nocif maximum sur l'éclosion chez les œufs de 24 h avec toutes les durées de stockage tandis qu'à 15° C, une éclosion irrégulière commence 15 jours après la durée de la réfrigération. L'éclosion moyenne des œufs de tous les âges est la plus élevée à 10° C avec plus de 60 % d'éclosion jusqu'à une période de 20 jours puis elle baisse. On observe que l'âge des œufs et la durée de réfrigération à quatre températures différentes ont un effet significatif sur le pourcentage d'éclosion.*

INTRODUCTION

L'émergence des papillons et une durée de grainage prolongée au printemps entraînent une perte considérable en pontes saines chez le ver à soie tassar du chêne. Les œufs sans diapause éclosent généralement du 9^{ème} au 11^{ème} jour après l'accouplement (Jolly et coll., 1975). Avec le grainage commercial, il devient nécessaire de mettre au point des techniques de retardement de l'éclosion pour la synchroniser avec la pousse des feuilles, la distribution retardée et en masse des pontes etc.. (Datta et coll., 1972). Il existe un nombre d'informations considérable sur la réfrigération des œufs chez d'autres vers à soie (Datta et coll., 1972 ; Sakaguchi, 1978 ; Chaudhuri et coll., 1987 ; Nangia & Nagesh Chandra, 1988 ; Kumar & Thangavelu, 1993). Il existe quelques travaux chez le ver à soie du chêne tassar mais ils sont contradictoires (Ibohal et coll., 1987 & Pandey et coll., 1992). L'étude actuelle a donc été entreprise pour s'assurer de l'âge, de la température et de la durée de réfrigération des œufs ayant un effet nocif minimum sur l'éclosion.

MATERIELS ET METHODES

Les œufs pondus le 1^{er}, le 2^{ème}, le 3^{ème} jour par un nombre fixe de papillons femelles fécondés sont recueillis de manière simultanée pendant le grainage de la récolte de printemps. Les œufs sont mélangés et réfrigérés 24, 48 et 72 h après la ponte à 0 ± 1, 5 ± 1, 10 ± 1 & 15 ± 1° C pendant une durée de 5 à 35 jours avec un intervalle de 5 jours. Trois cent œufs en 3 répétitions de 100 chacune sont pris pour chaque lot de température, d'âge des œufs, et de durée de réfrigération. Après un stockage programmé, les œufs sont libérés à des températures intermédiaires et incubés à 24 ± 2° C. On calcule le pourcentage d'éclosion en enregistrant l'éclosion pendant 3 jours consécutifs. Un témoin

est maintenu séparément sans traitement à froid. Les données sont analysées statistiquement en utilisant l'analyse de variance.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données présentées dans le Tableau I présentent une fourchette d'éclosion entre 71,7 % pour les œufs de 24 h (10° C, 5 jours) et 6,3 % chez les œufs du même âge (0° C, 35 jours). On trouve que le pourcentage moyen d'éclosion chez les œufs de 24, 48 et 72 h. est le plus élevé à 10° C (61,7 ; 60,1 et 57,4), suivi par 5° C (53,3 ; 57,0 et 55,7), 15° C (43 ; 53,9 et 53,3) et 0° C (27,9 ; 53,9 et 50,7). Au fur et à mesure que la durée de réfrigération augmente, l'éclosion décline chez les œufs quels que soit l'âge des œufs et les températures auxquels ils sont réfrigérés. Les résultats de l'analyse de variance pour différentes températures indiquent un effet très significatif de l'âge et de la durée de la réfrigération sur l'éclosion des œufs de *A. proylei*.

Howe (1967) a signalé que le 1^{er} stade du développement embryonnaire des œufs de l'insecte est très crucial, ils sont alors sensibles à une température basse, mais les œufs plus âgés deviennent progressivement plus résistants à une température basse (Walters, 1967).

Chez *P. ricini* (Narashimhanna, 1967) et *B. mori* (Sakaguchi, 1978), la blastocinèse a lieu le 4^{ème} et le 5^{ème} jour de l'incubation pendant laquelle ils peuvent survivre à l'exposition à une température mortelle comme l'ont suggéré en général Andrewarthe & Birch (1954).

Pandey et coll., (1992) ont aussi observé la sensibilité des œufs de *A. proylei* à une température basse (5 ± 2° C) jusqu'à la blastocinèse qui est censée avoir lieu le 1^{er} jour de la ponte. Tandis que Nangia & Nageshchandra (1988) ont enregistré une bonne éclosion des œufs de *Samia cynthia ricini* (pondus en 72 h) jusqu'à une période de 15 jours avec une réfrigération à 0° C.

Dans cette étude, la réfrigération à 0 et 15° C a un effet nocif maximum chez les œufs de 24 h pour lesquels on observe moins de 50 % d'éclosion avec toutes les durées de stockage.

A 5° C, on observe plus de 60 % d'éclosion chez les œufs de 24 h jusqu'à une période de 15 jours et on observe la même chose chez des œufs de 48 et 72 h jusqu'à 20 jours. Tandis qu'à 10° C, l'éclosion dépasse 60 % pour les œufs de tous les âges jusqu'à 20 jours et baisse après. Nos observations sont contraires à celles de Pandey et coll., (1992) qui ont signalé qu'à partir du 2^{ème} jour, les œufs de *A. proylei* développent une résistance au froid (5 ± 2° C) jusqu'à 40 jours avec moins de 10 % de perte. Avec l'augmentation de l'âge des œufs de 24 h à 48 h, le pourcentage moyen d'éclosion augmente à 0° C tandis qu'il baisse entre 24 et 72 h à 10° C. Datta et coll., (1972) ont aussi observé une augmentation du pourcentage de mortalité chez *B. mori* avec l'augmentation de l'âge des œufs lors de l'exposition à une température basse de 5 à 7° C et signalé que les œufs de 36 h sont plus adaptés à une conservation à long terme que les œufs plus âgés pour obtenir une éclosion maximum. Vishwakarma (1982-83) a observé qu'à 7 ± 2° C, les œufs de *P. ricini* de 3 jours en été et les œufs de 5 jours en hiver sont plus résistants au froid qu'à 3 ± 1° C (Govindan et coll., 1980) où la réfrigération au-delà de 5 jours a un effet nocif sur l'éclosion.

La réfrigération à 15° C a peu d'impact sur le retardement de l'éclosion des œufs de tous les âges et ils présentent une éclosion faible et irrégulière au-delà de 15 jours de réfrigération, qui pourrait être due au fait que le développement de l'embryon ne s'arrête pas. Nangia & Nageshchandra (1988) ont aussi fait des observations similaires chez les œufs de *Samia cynthia ricini* réfrigérés à 15° C et rapporté que le stockage des œufs à 5-10° C pendant 5 à 10 jours donne le taux effectif d'élevage le plus élevé (ERR). Ainsi, on en a conclu que les œufs des 3 âges peuvent être stockés sûrement à 5-10° C pendant une durée de 15 à 20 jours sans effet nocif sur l'éclosion d'*Antheraea proylei*.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	589
General sericulture	
Mûrier	593
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	597
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	603
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	605
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	609
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	615
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes.	617
Silkworms: silk glands	
Soie	619
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian.</i>	(C) Chinois / <i>Chinese.</i>
(D) Allemand / <i>German.</i>	(E) Anglais / <i>English.</i>
(F) Français / <i>French.</i>	(J) Japonais / <i>Japanese.</i>
(I) Italien / <i>Italian</i>	(Pl) Polonais / <i>Polish.</i>
(K) Coréen / <i>Korean.</i>	(R) Russe / <i>Russian</i>
(Pt) Portugais / <i>Portuguese.</i>	(S) Espagnol / <i>Spanish.</i>
(Ro) Roumain / <i>Rumanian.</i>	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the abstract.

Sériciculture générale

General sericulture

Role of cost and management accountant for promotion of sericulture industry in the present global market.

ANTARYAMI JENA

Orissa, Co-operative Silk Federation (SERIFED), Ltd. Bhubaneswar, Orissa 751007, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 104-107. (E)

Soil fertility, leaf quality and cocoon crop performances in a bivoltine seed area, Anekal in Karnataka.

CHALUVACHARI, BONGALE U.D., MANJUNATH M.S., ANATHARAMAN M.N.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560062, Karnataka, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 57-62. (E)

***Eri pupae* - A popular cuisine too !**

CHAOBA SINGH K., SURYANARAYANA N.

CMERTI, Lahdoigarh, Jorhat, Assam, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 57-58. (E)

***Eri pupae* oil.**

CHOUDHURY S.Kr.

Department of Chemistry, Cotton College, Guwahati (Assam), India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 55-56. (E)

Study on some bulgarian hybrids of silkworm (*Bombyx mori* L.) in conditions of Egypt.

GREIS H., PETKOV N., NACHEVA I., TSENOV P.

Agricultural firm Agromier - Cairo - Egypt.

2002 Journal of Animal Science, Vol. XXXIX(1), 19-22. (B,e)

Reintroduction of *eri* culture in Andhra Pradesh : hopes galore.

JAYAPRAKASH P., RAO B.V.S., VENKATESHWAR RAO K., KRISHNA RAO J.V.,
SINHA B.R.R.P

RTRS - Warangal -India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 19-20. (E)

Sericulture in Jammu & Kashmir - Past, present and future.

KHAN M.A., NISAR AHMAD M., ZEYA S.B.

Central Silk Research and Training Institute, Pampore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(10), 5-8. (E)

Reeling technology package for quality dupion silk.

NAIK S.V., SHILLIN S.H., HARIRAJ G., MAHESH K.N., SUBRATA ROY, SOMASHEKAR T.H.
Central Silk Technological Research Institute, CSB, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(10), 23-25. (E)

Eri culture in Uttar Pradesh.

PANDEY R.K.

Shramik Bharati, Kanpur (Uttar Pradesh), India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 21-24. (E)

Adoption of branch feeding technology in semi-arid zone of Karnataka.

PRABHAKARA RAO A., SEKHARAPPA B.M., RAGHURAMAN R., BONGALE U.D.

KSSRDI, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(10), 15-16. (E)

Eri culture - An additional source of income for tapioca farmers.

PRAKASH K.S. *et al.*

BSM & TC, Rampachodavaram, Andhra Pradesh, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 29-30. (E)

Eri spinning on ambar charakha - An experience.

RABINDRA NATH UPADHYAY, DAS P.K.

TAGS, Kumarikata, Tamulpud, Dist. Nalbari, Assam, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 53-54. (E)

Eri is enterprising.

RAMESHA M.N.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 39-41. (E)

Utilization of fermented silkworm pupae silage in feed for carps.

RANGACHARYULU P.V., *et al.*

2003 Bioresource Technology, Vol. 86(1), 29-32.

A thought for development of Eri culture in India.

SARATCHANDRA B.

Central Silk Board, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 25-28. (E)

Experience on Eri silk from the grassroots.

SHUKLA S., SAHU R.K., PATEL M.

Grassroot Innovation Augmentation Network, Ahmedabad, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 31-32. (E)

An integrated approach in the pest management in sericulture.

SINGH R.N., SARATCHANDRA B.

Central Silk Board, B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore 560068, India.

2002 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 5(2), 141-151. (E)

Performance of Mysore and Berhampore-silkworm races under/temperate climatic conditions.

SOFI A.M.

Division of Sericulture Mirgund SKUAST, G.P.O. Post Box N 868, Kashmir, Srinagar 190001, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 101-103. (E)

Recent advances in Eri silk spinning, weaving and future prospects.

SOMASHEKAR T.H.

Central Silk Technological Research Institute, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 49-52. (E)

Breeding for sex-limited cocoon colour breeds.

SUDHAKARA RAO P., BASAVARAJA H.K., NISHITHA NAIK V., PALLAVI S.N.,
MAHALINGAPPA

Central Sericultural Research & Training Institute, Srirampura, Mysore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(10), 9-11. (E)

Recent advances in Eri culture.

SURYANARAYANA N., DAS P.K., SAHU A.K., SARMAH M.C., PHUKAN J.D.

Central Muga Eri Research & Training Institute, Lahdoigarh, Jorhat, Assam, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 5-12. (E)

UNDP assistance in development of eri culture.

TEOTIA R.S., SATHYANARAYANA K., RAJSHEKAR K., GOEL R.K., KRISHNA RAO J.V.

Central Silk Board, Bangalore, India.

2003 Indian Silk, Vol. 41(12), 13-18. (E)

Mûrier

Mulberry

Effect of induced salt stress on growth and uptake of mineral nutrients in mulberry (*Morus alba*) genotypes.

AGASTIAN S.T.P., VIVEKANANDAN M.

1997 *Indian J. Agricultural Sciences*, Vol. 67(10), 469-472.

Manganese deficiency in mulberry under fiels conditions.

BONGALE U.D., MANJUNATH J.M.S., CHALUVACHARI.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560062, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(1), 42-45. (E)

Variation in photosynthetic rates and biomass productivity among four mulberry cultivars.

CHAITANYA K.V., MASILAMANI S., JUTUR P.P., REDDY A.R.

2002 *Photosynthetica*, Vol. 40(2), 305-308.

Response of mulberry brown leaf spot fungus *Myrothecium roridum* to different plant extracts.

CHATTOPADHYAY S., MAJIL M.D., PRATHEESSHKUMAR, DAS K.K., SARATCHANDRA B.

Mulberry Pathology Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742101, West Bengal, India

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 183-188. (E)

Deproteinized mulberry leaf juice - A new media for growth of microorganisms.

CHAWDARY N.B., NISHITHA NAIK V., SHARMA D.D., GOVINDAIAH

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 217-220. (E)

An evolutionary perspective of Pierce's disease of grapevine, Citrus variegated chlorosis, and mulberry leaf scorch diseases.

CHEN J., HARTUNG J.S., CHANG C.J., VIDAVER A.K.

2002 *Curr. Microbiol.*, Vol. 45(6), 423-428.

Studies on sprouting and cold hardiness of mulberry (*Morus*) during wintering and thawing periods.

CHOI Y.C., RYU K.S., AHN Y.H., LEE W.C.

1997 *RDA J. Industrial Crop Science*, Vol. 39(1), 22-27.

Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2.
HIRADATE S., YOSHIDA S., SUGIE H., YDA H., FUJII Y.
2002 *Phytochemistry*, Vol. 61(6), 693-698.

Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees.
LU M.C.
2002 *Scientia Horticulturae*, Vol. 96(1-4), 329-341.

Inoculation of field-established mulberry and papaya with arbuscular mycorrhizal fungi and a mycorrhiza helper bacterium.
MAMATHA G., BAGYARAJ D.J., JAGANATH S.
Dpt of Agric. Microbiology, Univ. Agric. Sci., GKVK Campus, Bangalore 560 065, Karnataka, India.
2002 *Mycorrhiza*, Vol. 12(6), 313-316. (E)

Hepatoprotective and free radical scavenging activities of prenylflavonoids, coumarin, and stilbene from *Morus alba*.
OH H., KO E.K., JUN J.Y., OH M.H., PARK S.U., KANG K.H., LEE H.S., KIM Y.C.
2002 *Planta Med.*, Vol. 68(10), 932-934.

Nature of acidity and available nutrient status of some mulberry growing acid soils of Karnataka.
PRABHURAJ D.K., THIMAREDDY H., MAHADVAPPA L., BONGALE U.D., DANDIN S.B.
Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560062, India.
2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(1), 67-71. (E)

Evaluation studies of some bio-control agents against corn borers in Egypt.
SAVVOUR, MAGDA M.
Department Pests and Plant Protection, National Research Center, Dokki, Cairo, Egypt.
2002 *Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo*, Vol. 47(3), 1033-1043. (E)

Effect of giant african snail *Achatina fulica* Bowdich infestation on the nutritional quality of mulberry (*Morus* sp.) leaves.
SHREE M.P., RAVI KUMAR K.
Department of Studies in Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560056, Karnataka, India.
2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(1), 50-56. (E)

Determination of rutin and quercetin in mulberry leaves by high performance capillary electrophoresis.
SUN L., MENG L., CHEN J., MA J., HU R., JIA DZ.
Department of Chemistry, Xinjiang Medical University, Wulumuqi 830042, China.
2001 *Se Pu*, Vol. 19(5), 395-397. (E)

Photosynthesis and the enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in mulberry during water stress and recovery.
THIMMANAIK S., KUMAR S.G., JUMARI G.J., SURYANARAYANA N., SUDHAKAR C.
2002 *Photosynthetica*, Vol. 40(2), 233-236.

Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellar location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree.
VAN DAMME E.J.M., HAUSE B., HU J.L., BARRE A., ROUGE P., PROOST P., PEUMANS W.J.
2002 *Plant Physiology*, Vol. 130(2), 757-769.

Studies on the comparative performance of Victory-1, S-36 and Kanva-2 mulberry genotypes and their impact on silkworm rearing under telangana conditions of Andhra Pradesh.

VENKATARAMANA P., *et al.*

C.S.R.T.I. Research Extension Centre, Central Silk Board, Vikarabad 501101, India.

2002 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 5(2), 175-182. (E)

Ecological characteristics and biological control of mulberry anthracnose.

YOSHIDA S., SHIRATA A., HIRADATE S.

2002 Japan Agric. Research Quarterly, Vol. 36(2), 89-95.

Bombyx mori : élevage, nutrition, pathologie

Bombyx mori : rearing, feeding, pathology

Promotion of nucleopolyhedrovirus infection in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) by an antibiotic, nikkomycin Z.

ARAKAWA T., SUGIYAMA M.

2002 Appl. Entomol. Zoo., Vol. 37(3), 393-397.

Estimates of cross breeding effects for cocoon weight at diallele crossing of newly created silkworm lines.

ARNAUDOVA K.

High School "Agricultural College" - Plovdiv.

2002 Journal of Animal Science, Vol. XXXIX(1), 22-26. (B,e)

The effect of mulberry varieties on the performance of Chul Thai 5 silkworm race.

ASHIRU M.O.

2002 Discovery and Innovation, Vol. 14(1/2), 77-83. (E)

Infection of the silkworm, *Bombyx mori*, with *Cordyceps militaris*.

CHEN R., ICHIDA M.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Saga-Ippongi 1, Ukyou-ku, Kyoto 616-8354, Japan.

2002 Journal of insect Biotechnology and Sericology, Vol. 71, 61-63. (E)

Hybrid vigour in three way crosses of mulberry silkworm *Bombyx mori* L.

DAS S.K., GHOSH B., PATTNAIK S., DAS N.K., SINGH T., SEN S.K., RAO G.S.

1997 Indian J. Genetics and Plant Breeding, Vol. 57(4), 447-453.

Genetic selection studies at different rearing conditions of silkworm *Bombyx mori* L. in Egypt.

I- Phenotypic parameters of basic productive traits.

GREISS H., PETKOV N., BOYCHEV K., PETKOV Z.

Agromier Agricultural firm - Cairo - Egypt.

2002 Journal of Animal Science, Vol. XXXIX(6), 69-72. (B,e)

Genetic selection studies at different rearing conditions of silkworm *Bombyx mori* L. in Egypt.

II- Correlation dependencies between the basic productive traits.

GREISS H., PETKOV N., BOYCHEV K., PETKOV Z.

Agromier Agricultural firm - Cairo - Egypt.

2002 Journal of Animal Science, Vol. XXXIX(6), 73-75. (B,e)

Relationship between spinning and pupation in silkworm, *Bombyx mori*.

KIYOSAWA M., KYUCHI M.

2001 *Bull. Gunma Seric. Exp. Sta.*, Vol. 7, 45-49.

BmNPV alters NADP-dependent malate dehydrogenase activity and associated macromolecules and retards growth and development of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., during the final instar.

KRISHNAN N., CHAUDHURI A.

2002 *Canadian J. Zool.*, Vol. 80(8), 1451-1459.

Inheritance of trait shape of cocoon in hybrids between mono-bivoltine and polyvoltine breeds of silkworm (*Bombyx mori* L.).

LAZAROV Yu., TSENOV P., NACHEVA I.

Institute of Animal Science - Kostinbrod - Base Vratsa.

2002 *Journal of Animal Science*, Vol. XXXIX(3), 74-78. (B,e)

Inheritance of trait colour of silkworm in hybrids between mono-bivoltine and polyvoltine breeds of silkworm (*Bombyx mori* L.).

LAZAROV Yu., TSENOV P., NACHEVA I.

Institute of Animal Science - Kostinbrod - Base Vratsa.

2002 *Journal of Animal Science*, Vol. XXXIX(3), 69-73. (B,e)

Inheritance of the traits colour of hemolymph and of cocoons in hybrids between mono-bivoltine and polyvoltine silkworm breeds (*Bombyx mori* L.).

LAZAROV Yu., TSENOV P., NACHEVA I.

Institute of Animal Science - Kostinbrod - Base Vratsa.

2002 *Journal of Animal Science*, Vol. XXXIX(3), 65-68. (B,e)

Photoinactivation of vesicular stomatitis virus by a photodynamic agent, chlorophyll derivatives from silkworm excreta.

LIM D.S., KO S.H., KIM S.J., PARK Y.J., PARK J.H., LEE W.Y.

2002 *J. Photochemistry and Photobiology - B: Biology*, Vol. 67(3), 149-156.

Changes in protein and reducing sugar content of the haemolymph during instar development of *Bombyx mori*.

MAHADEV KUMAR SOWRI D., SARANGI S.K.

Dept. of Sericulture, Jnana Bharatri, Bangalore University, Bangalore 560056, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seric.*, Vol. 6-1), 46-49. (E)

Effect of systemic fungicide on total hemocyte count and hemolymph biochemical changes in silkworm, *Bombyx mori* L., infected with *Beauveria bassiana*.

MALLIKARJUNA M., BALAVENKATASUBBAIAH M., NATARAJU B., THIAGARAJAN V.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 189-194. (E)

Consumption and conversion efficiency of food in new elite bivoltine hybrid silkworm, *Bombyx mori* L. under restricted feeding levels.

MATHUR V.B., RAHMATHULLA V.K., VIJAYA BHASKAR O.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 213-216. (E)

Effect of shootlet feeding during young age of silkworm *Bombyx mori* L. and its impact on cocoon production.

MATHUR V.B., RAVI H.K., RAHMATHULLA V.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 86-89. (E)*

Disintegration of the peritrophic membrane of silkworm larvae due to spindles of an entomopoxvirus.

MITSUHASHI W., MIYAMOTO K.

National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, 305/8634, Ibaraki, Japan.

2003 *J. Invertebr. Pathol., Vol. 82(1), 34-40. (E)*

Studies on heterosis expression among the selected multivoltine x bivoltine crosses of silkworm (*Bombyx mori* L.)

NARAYANSWAMY T.K., ANATHANARAYAN S.R., GOVINDA R.

Department of Sericulture, USA GKV, Bangalore 560065, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 72-77. (E)*

Evaluation of bivoltine x multivoltine hybrids of silkworm *Bombyx mori* L. for rearing traits through estimation of combining ability.

NARAYANSWAMY T.K., GOVINDAN R., ANATHANARAYANA S.R., RAMESH S.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKV, Bangalore 560065, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 78-85. (E)*

Application of systemic fungicide for control of white muscardine in silkworm *Bombyx mori* L.

NATARAJU V.B., THIAGARAJAN V., DATTA R.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, Karnataka, India.

2002 *Int. J. Indust. Entomol., Vol. 5(2), 171-174. (E)*

Baculovirus studies in new, indigenous lepidopteran cell lines.

PANT U., SUDEEP A.B., ATHAWALE S.S., VIPAT V.C.

National Institute of Virology, 20-A, Dr Ambedkar Road, Pune 411001, India.

2002 *Indian J. Exp. Biol., Vol. 40(1), 63-68. (E)*

Role of *Nosema bombycis* infected male silk moths in the venereal transmission of pebrine disease in *Bombyx mori* (Lep., Bombycidae).

PATIL C.S., JYOTHI N.B., DASS C.M.S.

2002 *J. Applied Entomology, Vol. 126(10), 563-566.*

Analysis of case of the mounting operations in the Sericultural farm household.

SHIROTA T.

Institute of Sericulture

2002 *Journal of Dainippon Silk Foundation, Vol. 50, 69-77. (J,e)*

Effect of disinfection of mountages and its effect on cocoon quality and reeling parameters.

SINGH G.B., HIMANTHRAJ M.T., RAJAN R.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 90-95. (E)*

Studies on silk productivity in some three-way crosses of the silkworm *Bombyx mori* L.

SINGH T.

Central Silk Board, BTM Layout, Bangalor 560068, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 96-98. (E)*

On the breeding of "CSR18 x CRS19" - A robust bivoltine hybrid of silkworm, *Bombyx mori* L. for the tropics.

SURESH KUMAR N., BASAVARAJA H.K., KISHOR KUMAR C.M., MAL REDDY N., DATTA R.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 153-162. (E)

Corazonin reduces the spinning rate in the silkworm, *Bombyx mori* L.

TANAKA Y., HUA Y.J., ROLLER L., TANAKA S.

2002 *J. Insect Physiol.*, Vol. 48(7), 707-714.

Studies on heterosis and its components at silkworm hybrids (*Bombyx mori* L.) with participation of the tropical breed bonde 517. III. Traits that characterize conversion of digested mulberry leaves.

TSENOV P., PETKOV N., NACHEVA J.

Institute of Animal Sciences - Kostibrod - Base Vratsa.

2002 *Journal of Animal Science*, Vol. XXXIX(1), 27-30. (B,e)

Studies on heterosis and its components at silkworm hybrids (*Bombyx mori* L.) with participation of the tropical breed bonde 517. IV. Growth rate and consumption index of silkworm.

TSENOV P., PETKOV N., NACHEVA J.

Institute of Animal Sciences - Kostinbrod - Base Vratsa.

2002 *Journal of Animal Science*, Vol. XXXIX(1), 31-34. (B,e)

Studies on heterosis and its components at silkworm hybrids (*Bombyx mori* L.) with participation of the tropical breed bonde 517. V. Provocative regime of silkworm feeding.

TSENOV P., PETKOV N., NACHEVA J.

Institute of Animal Sciences - Experimental Base Vratsa.

2002 *Journal of Animal Science*, Vol. XXXIX(2), 31-33. (B,e)

Possibility of reeling uzi pierced cocoons in combination with different proportions of normal cocoons of mulberry silkworm.

VIJAYENDRA M., REDDY D.N.R., RAMAKRISHNA NAIKA, MANJUNATH GOWDA.

Sericulture College, University of Agriculture Sciences, Chintamani 563125, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(1), 63-66. (E)

Effect of fenvalerate-20EC on sericigenous insects. I. Food utilization in the late-age larva of the silkworm, *Bombyx mori* L.

VYJAYANTHI N., SUBRAMANYAM M.V.

Department of Studies in Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560 056, India.

2002 *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Vol. 53(2), 206-211. (E)

Studies on feeding habit using artificial diet without mulberry for silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm resources.

YUEHUA Z., ANYING X., YADONG W., MUWANG L., CHENGXIANG H., GUOZHENG Z.

The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

2002 *Canye Kexue*, Vol. 28(4), 333-336. (C)

Effect of *Limonium bicolor* on *Bombyx mori* life-span.

ZHANG H., WANG J., LI S., HUANG L.

Second Deople's Hospital, Xianyang 712000, China.

1998 *Zhong Yao Cai*, Vol. 21(3), 144-146. (C,e)

Study on the biology feature and pathogenecities to silkworm of a microsporidium isolated from *Barathra brassicae* L.

ZHENG X., ZHOU Y., HUANG B., LU K., HUANG X.

Institute of Sericulture, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China.

2000 *Wei Sheng Wu Xue Bao*, Vol. 40(5), 540-544. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkwoms : rearing, feeding, pathology

Evaluation of some dietary components on certain biological aspects and digestive efficiency of *eri* silkworm. II- Consumption and utilisation of food.

ABDEL-KHALEK, AZZA A.

Plant Protection Department, Desert Research Center, Matariya, Cairo, Egypt.

2002 Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo, Vol. 47(3), 1055-1062. (E)

Evaluation of some dietary components on certain biological aspects and digestive efficiency of *eri* silkworm. I- Biological studies.

ABDEL-KHALEK, AZZA A.

Plant Protection Department, Desert Research Center, Matariya, Cairo, Egypt.

2002 Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo, Vol. 47(3), 1045-1054. (E)

Biology and ecology of the *eri* silkworm, *Samia ricini* (Donovan) (Saturniidae) : a review.

CHAOBA SINGH K., BENCHAMIN K.V.

Central Muga and Eri Research & Training Inst., Central Silk Board, Lahdoigarh 785700, Horhat, Assam, Indian.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 20-33. (E)

Using crowding and spacing for raising the *eri* silkworm *Philosamia ricini* Hutt.

EID M.A.A., EL-BASIONY M.N.

Laboratory of Agriculture, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza, Egypt.

2002 Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo, Vol. 47(3), 1087-1096. (E)

Aseptic rearing of the mulberry wild silkworm, *Bombyx mandarina*.

ICHIDA M., DOI S., MIURA Y., NAKAMURA T., BANNO Y.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Saga-ippongicho Ukyou-ku Kyoto-city, Kyoto, Japan.

2000 Int. J. Wild Silkworm & Silk, Vol. 5, 69-70. (E)

Genetic resources of *Quercus* : their maintenance, evaluation and utilization.

SRIVASTAV P.K., SINGH N.I., THANGAVELU K.

Regional Tasar Research Station, Imphal 795002, Manipur, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 34-41. (E)

Anti rat device for tasar grainages.

SUDHAKARA BABU CH., *et al.*

Research Extension Centre, Mulug, India.

2003 *Indian Silk*, Vol. 41(10), 17-19. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

The function of the nuclear matrix attachment region of silkworm rDNA as an autonomously replicating sequence in plasmid and chromosomal replication origin in yeast.

CHEN Y., ZHAO M., LI Z.P., HE M.L.

The Inst. of M. Biol., Open Lab of the Inst. of M. Tech. for Drug Disc. and Synt., The Univ. of Hong Kong, Hong Kong.

2002 Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 299(5), 723-729. (E)

Preliminary screening for isolation of gene encoding anti-bacterial protein from silkworm genomic library constructed in gamma-EMBL3 vector.

CHITRA S., CHINYA P.K., DATTA R.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore 570008, Karnataka, India.

2002 Bull. Ind. Acad. Seri., Vol. 6(1), 99-100. (E)

Construction of a novel Bm NPV bac to bac system.

DENG X., ZHU Y., DIAO Z., QI Y., ZHOU Z.

Najing Command Military Medical Institute, Nanjing 210002, China.

2000 Wai Sheng Wu Xue Bao, Vol. 40(2), 155-160. (C,e)

Molecular cloning and expression pattern of a *Cubitus interruptus* homologue from the mulberry silkworm *Bombyx mori*.

DHAWAN S., GOPINATHAN K.P.

2002 Mechanisms of Development, Vol. 118(1/2), 203-207.

Characterization of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus gp64 gene and analysis of elements regulating its early promoter activity.

FELIPE ALVES C.A., IKEDA M., KOBAYASHI M.

Lab. of Biodynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.

2002 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 71(3), 141-150. (E)

Cloning and expression of metallothionein gene of *Bombyx mori*.

HE X., CAI X., HUAI W., ZHANG B.

Institute of Microbiology, Academia Sinia, Beijing 100080, China.

2000 Wei Sheng Wu Xue Bao, Vol. 40(4), 384-388. (C,e)

Generation and characterization of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus mutants defective in pcna gene homologue.

IWAHON S., IKEDA M., KOBAYASHI M.

Lab. of Seric. ent Entom., Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.

2002 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 71(3), 129-139. (E)

Package of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus with heterogeneous polyhedrin protein.

JI P., ZHA X., ZHANG G., YU J., GU W., SHEN W.

College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

2002 *Wei Sheng Wu Xue bao*, Vol. 42(1), 50-55. (C,e)

Expression of human endostatin in larvae of silkworm (*Bombyx mori*) and in vitro activity assays.

JIN Y., WANG Y., ZHU Z., ZHANG Y.

2002 *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, Vol. 6(4), 293-299.

Analysis of alpha- and beta-tubulin genes of *Bombyx mori* using an EST database.

KAWASAKI H., SUGAYA K., QUAN G.X., NOHATA J., MITA K.

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine, Utsunomiya, 321-8505, Tochigi, Japan.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(1), 131-137. (E)

Effects of larval developmental stage on recombinant protein production in fourth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

KOZUMA K., HAMANO K.

Department of Biological Production, Faculty of Agriculture, Tokyo Univ., Saiwaicho 3-5-8, Fuchu, Tokyo 1838509, Japan.

2002 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 71(3), 173-176. (E)

Cloning of Cyc (Bmal1) homolog in *Bombyx mori*: structural analysis and tissue distributions.

MARKOVA E.P., UEDA H., SAKAMOTO K., OISHI K., SHIMADA T., TAKEDA M.

Div. of Mol. Sci., Graduate School of Sci. and Tech., Kobe Univ. 1-1 Rokkodai, Nada, 657-8501, Kobe, Japan.

2003 *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 134(3), 535-542. (E)

Cell-specific expression of enhanced green fluorescence protein under the control of neuropeptide gene promoters in the brain of the silkworm, *Bombyx mori*, using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-derived vectors.

MOTO K., KOJIMA H., KURIHARA M., IWAMI M., MATSUMOTO S.

The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Hirosawa 2-1, Wako-shi, 351-0198, Saitama, Japan.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(1), 7-12. (E)

Possible horizontal transfer of mariner-like sequences into some invertebrates including lepidopteran insects, a grasshopper and a coral.

NAKAJIMA Y., et al.

Div. of Functional Genomics, Center of Mol. Biosciences (COMB), Univ. of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 9030213, Japan.

2002 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 71(3), 109-121. (E)

Dosage effects of polyphagous genes, PhB, PhS and Sek, of the silkworm, *Bombyx mori*.

OHNUMA A., TAKEMURA Y., TAZIMA Y.

Institute of Sericulture

2002 *Journal of Dainippon Silk Foundation*, Vol. 50, 79-87. (J,e)

Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a novel cuticle protein in the silkworm, *Bombyx mori*.

SAWADA H., *et al.*

Biol. Lab., Center for Natural Science, Kitasato Univ., Kitasato 1-15-1, City, Kanagawa 228-8555, Sagamihara, Japan.

2003 *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 134(3), 519-527. (E)

Functional characterization and structural modelling of late gene expression factor 4 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

SEHRAWAT S., SRINIVASAN N., GOPINATHAN K.P.

2002 *Biochem. J.*, Vol. 368(part 1), 159-169.

Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach.

SEITZ V., *et al.*

Max-Planck Institute Molecular Genetics, Ihnestrasse 73, 14195, Berlin, Germany.

2003 *Dev. Comp. Immunol.*, Vol. 27(3), 207-215. (E)

Transgenic silkworms spin human collagen.

SENIOR K.

2002 *Lancet*, Vol. 360(9350), 2053. (E)

A diversity of U1 small nuclear RNAs in the silk moth *Bombyx mori*.

SIERRA-MONTES J.M., *et al.*

Department of Biological Sciences, OE304, Florida International University, 33199, Miami, FL, USA.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(1), 29-39. (E)

Examination of genetic relationships of silkworm stocks in Korea by additive isozyme analysis.

SOHN B.H., KIM H.S., KANG P.D., LEE S.U., SEONG S.I.

Dept of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441100, Korea.

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 205-211. (E)

Development and application of chymase inhibitors : recombinant human chymase produced by silkworm-baculovirus expression system : its application for a chymase detection kit.

SUZUKI T., *et al.*

Chuo-Sanken laboratory, Katakura Industries Co, Ltd.

2002 *Jpn J. Pharmacol.*, Vol. 90(3), 210-213. (E)

Cloning of anti-IPS factor cDNA from *Tachypleus tridentatus*, expression in *Bombyx mori* larvae and its biological activity in vitro.

WANG D.N., LIU J.W., YANG G.Z., ZHANG W.J., WU X.F.

2002 *Mol. Biotechnol.*, Vol. 21(1), 1-7.

The identification of BmNPV gp64 envelope gene.

WANG Y., LI Z., LONG Q., NONG G., WANG X.
State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China.

2000 *Wei Sheng Wu Xue Bao*, Vol. 40(1), 38-43. (C,e)

Expression of biologically active recombinant equine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae.

WU D., *et al.*

National Institute of Animal Health, Tsukuba, Ibaraki, 305-085t, Japan.

2002 *Cytokine*, Vol. 20(2), 63-69. (E)

Human therapeutic proteins from silkworms.

WURM F.M.

Faculty of Basic Sciences, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne, Lausanne, Switzerland.

2003 Nat. Biotechnol., Vol. 21(1), 34-35. (E)

DNA microarrays of baculovirus genomes: differential expression of viral genes in two susceptible insect cell lines.

YAMAGISHI J., ISOBE R., TAKEBUCHI T., BANDO H.

Laboratory of Applied Mol. Ent., Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., Hokkaido, Japan.

2003 Arch. Virol., Vol. 148(3), 587-297. (E)

Amplification, cloning and sequence analysis of spider dragline silk cDNA.

ZHANG L.S., MA H.W., LU Y.M., ZHANG Y.J.

Military Veterinary Institute, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China.

2002 Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, Vol. 18(5), 641-643. (C,e)

Promoter activities in the baculovirus envelope glycoprotein gp64 gene.

ZHOU Y.J., YI Y.Z., ZHANG Z.F., HE J.L., ZHANG Y.X., WU X.F.

Key Lab. of Silkworm Biotech., M. of Agric., Seric. R. Inst., C. Acad. of Agric. S., Zhenjiang 212018, China.

2003 Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), Vol. 35(1), 18-26. (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Pheophytin content and fibrinolytic activity of silkworm feces in the different larval stages of silkworms.

AHN M.Y., RYU K.S., KIM I., KIM J.W., LEE H.S., LEE Y.K., KIM E.S.

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441100, Korea.

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 195-199. (E)

Repetitive stimulation of olfactory receptor cells in female silkworm, *Bombyx mori* L.

BARROZO B., KAISLING K.E.

2002 *J. Insect Physiol.*, Vol. 48(8), 825-834.

Inhibition of cAMP signalling cascade-mediated Ca(2+) influx by a prothoracicostatic peptide (Mas-MIP I) via dihydropyridine-sensitive Ca(2+) channels in the prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*.

DEDOS S.G., BIRKENBEIL H.

Saxon Academy of Sciences at Leipzig, AG Prof. Dr. H. Penzlin, Erbertstr. 1, PF 100322, 07703, Jena, Germany.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(2), 219-228. (E)

Induction of dauer pupae by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori*.

DEDOS S.G., SZURDOKI F., SZEKACS A., MIZOGUCHI A., FUGO H.

2002 *J. Insect Physiol.*, Vol. 48(9), 857-865.

Fenoxycarb levels and their effects on general and juvenile hormone esterase activity in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

DEDOS S.G., SZURDOKI F., SZEKACS A., SHIOTSUKI T., HAMMOCK B.D., SHIMADA J., FUGO

2002 *Pesticide Biochem. and Physiol.*, Vol. 73(3), 174-187.

Movement behaviour of the eri silkworm larval *Philosamia ricini* Hutt.

EID M.A.A., EL-BASIONY M.N.

Laboratory of Sericulture, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza, Egypt.

2002 *Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo*, Vol. 47(3), 1077-1086. (E)

Effects of silk hydrates on the blood glucose metabolism in rats with experimental diabetes.

GAO J., BAI J., MAN Q., LIU G.

Institute of Nutrition and Food Hygiene, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China.

2000 *Wei Sheng Yan Jiu*, Vol. 29(4), 223-225. (C,e)**Mechanism of silk hydrates on modulating the blood glucose metabolism in rats with experimental diabetes.**

GAO J., BAI J., MAN Q., LIU G.

Institute of Nutrition and Food Hygiene, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China.

2000 *Wei Sheng Yan Jiu*, Vol. 29(6), 379-382. (C,e)**Effects of silkworm extract on streptozotocin-induced diabetic rats.**

HAN S.M., SUK Y.S., BAEK H.J., PARK H.R., HAN M.S.

College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702701, Korea.

2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 201-204. (E)**A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae.**HARA H., *et al.*

Graduate S. of Bio-Applic. and Systems Engin., Tokyo Univ. of Agric. and Tech., Koganei, 184-8588, Tokyo, Japan.

2003 *FEBS Lett.*, Vol. 538(1-3), 29-34. (E)**Visualization of modulatory effects of serotonin in the silkworm antennal lobe.**

HILL E.S., OKADA K., KANZAKI R.

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.

2003 *J. Exp. Biol.*, Vol. 206(pt2), 345-352. (E)**Ubiquitin ligase activities of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus RING finger proteins.**

IMAI N., MATSUDA N., TANAKA K., NAKANO A., MATSUMOTO S., KANG W.

Lab. of Molec. Entomol. and Baculov., Lab. of Molec. M. Biol., RIKEN, Wako 351-0198, Tokyo, Japan.

2003 *J. Virol.*, Vol. 77(2), 923-930. (E)**Cloning and expression of novel crystal protein genes cry39A and 39orf2 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* Bun1-14 encoding mosquitocidal proteins.**

ITO T., SAHARA K., BANDO H., ASANO S.

Department of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan.

2002 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 71(3), 123-128. (E)**Diapause phenomenon in tropical multivoltine races of *Bombyx mori* L. - A review.**

JAYASWAL K.P.

Central Sericultural Research & Training Institute, Srirampura, Mysore 570008, Karnataka, India.

2002 *Bull. Ind. Acad. Seri.*, Vol. 6(1), 1-19. (E)**Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* ovarioles in vitro : role of the lipid transfer particle.**

JOURNI Z.E., TAKADA N., GAZARD J., MAEKAWA H., WELLS M.A., TSUCHIDA K.

Dpt. of Biochem. & Molec. Biophysics, Biol. Sci. West, The Univ. of Arizona, PO Box 210066, 85721-0088, Tucson, AZ, USA.

2003 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33(2), 145-153. (E)

Applying fenoxycarb at the penultimate instar triggers and additional ecdysteroid surge and induces perfect extralarval molting in the silkworm.

KAMIMURA M., KIUCHI M.

2002 *Gen. and Comp. Endocrinol.*, Vol. 128(3), 231-237.

Interaction of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus BRO-A and host cell protein laminin.

KANG W.K., IMAI N., SUZUKI M., IWANAGA M., MATSUMOTO S., ZEMSKOV E.A.

Laboratory of Molecular Entomology and Baculovirology, RIKEN, Wako, Japan.

2003 *Arch. Virol.*, Vol. 148(1), 99-113. (E)

Projection to higher olfactory centers from subdivisions of the antennal lobe macroglomerular complex of the male silkworm.

KANZAKI R., SOO K., SEKI Y., WADA S.

Inst. of Biological Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.

2003 *Chem. Senses*, Vol. 28(2), 113-130. (E)

Positive and negative modulation of *Bombyx mori* adenylate cyclase by 5-phenyloxazoles : identification of octopamine and tyramine receptor agonists.

KHAN M.A., NAKANE T., OHTA H., OZOE Y.

Dpt of Life Sci. and Biotech., F. of Life and Environ. Sci., Shimane University, matsue, Shimane, Japan.

2003 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 52(1), 7-16. (E)

Entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* inhibits host insect molting by C22-oxidizing inactivation of hemolymph ecdysteroids.

KIUCHI M., YASUI H., HAYASAKA S., KAMIMURA M.

National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japan.

2003 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 52(1), 35-44. (E)

Superoxide dismutase activity in haemocytes and haemolymph of *Bombyx mori* following bacterial infection.

KRISHANAN N., CHATTOPADHYAY S., KUNDU J.K., CHAUDHURI A.

2002 *Current Science*, Vol. 83(3), 321-325.

Studies on the structure and function of cocoon protease inhibitors.

KURIOKA A.

Silk Science Research Institute

2002 *Journal of Dainippon Silk Foundation*, Vol. 50, 1-68. (J,e)

Developmental changes in the ability to synthesize juvenile hormone in vitro by *Corpora allata* from the eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae).

LI S., JIANG R.J., CAO M.X.

Shanghai Inst. of Entomol., Shanghai Inst. for Biol. S., C. Acad. of Sci., 225, Chongqing Road, Shanghai 200025, China.

2002 *Eur. J. Entomol.*, Vol. 99, 413-419. (E)

Allatotrophic and allatostatic activities in extracts of brain and the effects of *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostatin on juvenile hormone synthesis in vitro by *Corpora allata* from the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini*.

LI S., JIANG R.J., CAO M.X.

2002 *Physiological Entomological*, Vol. 27(4), 322-329.

Expression of *Schistosoma japonicum* fatty acid binding protein gene in silkworm cells and larvae.

LIU J., *et al.*

Shanghai Inst. of Animal Parasitology, CAAS, Key Lab. of Animal Parasitology, Min. of Agricult., Shanghai 200232, China.

1999 *Shongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, Vol. 17(4), 218-221. (C,e)

Changes in brain monoamine content in diapause pupa of *Antheraea pernyi* when activated under long-day and by chilling.

MATSUMOTO M., TAKEDA M.

2002 *J. Insect Physiol.*, Vol. 48(8), 765-771.

Chemical characterisation of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkmorm, *Bombyx mori*.

MATSUMOTO S., *et al.*

RIKEN, Inst. of Physical and Chemical Research, Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan.

2002 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 32(11), 1447-1455. (E)

Chemical characterization of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkmorm, *Bombyx mori*.

MATSUMOTO S., FONAGY A., YAMAMOTO M., WANG F., YOKOYAMA N., ESUMI Y., SUZUKI Y.

2002 *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, Vol. 32(11), 1447-1455.

Changes in growth and lipid profiles of silk gland, mid-gut biochemical composition of silkworm, *Bombyx mori* L. on exposure to prostaglandin F2 alpha.

MIAO Y.G., JIANG L.J.

Department of Sericulture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2003 *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, Vol. 70(3-4), 331-338. (E)

Solution structure of paralytic peptide of silkworm, *Bombyx mori*.

MIURA K., KAMIMURA M., AIZAWA T., KIUCHI M., HAYAKAWA Y., MIZUGUCHI M., KAWANO K.

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1-40-2 Nisshin, Saitama, 331-8537, Saitama, Japan.

2002 *Peptides*, Vol. 23(12), 2111-2116. (E)

Basic pattern of fluctuation in hemolymph PTTH titers during larval-pupal and pupal-adult development of the silkworm, *Bombyx mori*.

MIZOGUCHI A., DEDOS S., FUGOS H., KATAOKA H.

2002 *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 127(2), 184.

Moth performance binding proteins contribute to the excitation of olfactory receptor cells.

POPHOF B.

Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie Seewiesen, 82319 Starnberg, Germany.

2002 *Naturwissenschaften*, Vol. 89(11), 515-518. (E)

Sex determination in flies, fruitflies and butterflies.

SACCONI G., PANE A., POLITO L.C.

Dpt. di Genetica, Biol. Gen. e Molec., Univ. degli Studi di Napoli Federico II, Via Mezzocannone 8, 80134 Napoli, Italy.

2002 *Genetica*, Vol. 116(1), 15-23. (E)

Virtual reality experiments on a digital servosphere: guiding male silkworm moths to a virtual odour source.

SAKUMA M.

2002 *Computers and Electronics in Agriculture*, Vol. 35(2-3), 243-254.

Establishment of two new cell lines from *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae) and their susceptibility to baculoviruses.

SUDEEP A.B., MISHRA A.C., SHOUCHE Y.S., PANT U., MOURYA D.T.

2002 *Indian J. Med. Res.*, Vol. 115, 189-193.

PTTH-a potential growth activator in silkworm, *Bombyx mori* L. for enhancing silk production.

TRIVEDY K., NAIR K.S., CHINPA P.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore 570008, India.

2000 *Indian J. Exp. Biol.*, Vol. 38(9), 936-941. (E)

Effects of heavy-ion radiosurgery on the hemopoietic function of the silkworm *Bombyx mori*.

TU Z.L., KOBAYASHI Y., KIGUCHI K., WATANABE H., YAMAMOTO K.

Dpt of Radiation R. for Envir. and R., Takasaki Radiation Chemistry R. Establishment, JAERI, Watanukimachi 1233, Japan.

2002 *J. Radiat. Res.*, Vol. 43(3), 269-275. (E)

Specific binding of silkworm *Bombyx mori* 30-kDa lipoproteins to carbohydrates containing glucose.

UJITA M., KIMURA A., NISHINO D., YOKOYAMA E., BANNO Y., FUJII H., HARA A.

Lab. of Biol. Chem., Dpt of Applied Biol. Chem., Fac. of Agric., Meijo Univ., Tempaku-ku, Nagoya 468-8502, Japan.

2002 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 66(10), 2264-2266. (E)

Small GTP binding proteins : rab GTPases from the brain of *Bombyx mori*.

UNO T., HIRAGAKI S.

Lab. of Biol. Chem., Dpt of Biofunctional Chem., Fac. of Agric., Kobe University, Nada-ku Hyogo, Japan.

2003 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 52(3), 130-138. (E)

Effect of fenvalerate-20EC on sericigenous insects. II. Digestive enzymes in the nutritive physiology of silkworm, *Bombyx mori* L.

VYJAYANTHI N., SUBRAMANYAN M.V.V.

2002 *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 53(2), 212-220.

Mannose-specific lectin activity of parasporal proteins from a lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strain.

WASANO N., OHGUSHI A., OHBA M.

2003 *Curr. Microbiol.*, Vol. 46(1), 43-46.

The fungicidal effect of the antibacterial peptide CM4 from Chinese silkworm on *Fusarium moniliforme*.

XU J.S., ZHUANG S.Q.

School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China.

2001 *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, Vol. 34(3), 177-181. (C,e)

Effects of silkworm pupa oil on serum lipids level and platelet function in rats.

YANG X., HUANG L., HU J., LI T.

Dpt of Nutrition and Hygiene, Tongji Medical C. of Huazhong, Univ. of Sci. and Tech., Wuhan 430030, China.

2002 *Wei Sheng Yan Jiu*, Vol. 31(4), 249-251. (C,e)

Expression of the artificial cecropin CMIV-like gene of Chinese silkworm *Bombyx mori* in *Laphygma exigua* larvae.

ZHAO D., DAI Z., ZHOU K., ZHANG L.

College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China.

2001 *Wei Sheng Wu Xue Bao*, Vol. 41(6), 680-685. (C,e)

Molecular cloning and function of ecdysis-triggering hormones in the silkworm *Bombyx mori*.

ZITNAN D., HOLLAR L., SPALOVSKA I., TAKAC P., SITNANOVA I., GILL S.S., ADAMS M.E

2002 *J. Experimental Biol.*, Vol. 205(22), 3459-3473.

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Effect of preservation temperature on hatchability and embryogenesis of *Bombyx mori* L., eggs.
EID M.A.A., EL-BASIONY M.N.

Laboratory of Sericulture, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza, Egypt.

2002 Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo, Vol. 47(3), 1063-1075. (E)

Effect of the clinostat rotation on blastokinesis of the silkworm, *Bombyx mori*.

KOTANI E., FUROSAWA T., WATANABE T., SUGIMURA Y., ICHIDA M.

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Japan.

1999 Biol. Sci. Space, Vol. 13(3), 136-137. (E)

A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*.

MAKKA T., SEINO A., TOMITA S., FUJIWARA H., SONOBE H.

2002 Arch. Insect Biochem. and Physiol., Vol. 51(3), 111-120.

Effect of prostaglandin F2 alpha on gonadal carbohydrate metabolism of silkworm, *Bombyx mori* L.

MIAO YG., BHARATHI D.

Dpt of Sericulture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou-310029, China.

2003 Prostaglandins Other Lipid Mediat., Vol. 70(3-4), 259-266. (E)

Differential expression of the two cold-inducible genes, Samui and sorbitol dehydrogenase, in *Bombyx* diapause eggs exposed to low temperatures.

MORIBE Y., SHIROTA T., KAMBA M., NIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.

Lab of Seric. and Entomoresources, Graduate School of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.

2002 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 71(3), 167-171. (E)

A GATA-binding expressed predominantly in the pupal ovary of the silkworm, *Bombyx mori*.

PRIYADARSHINI P., MURTHY B.S., NAGARAJU J., SINGH L.

Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, ECIL Road, Nacharam, 500 076, Hyderabad, India.

2003 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 33(2), 185-195. (E)

Purification and characterization of an ommin-binding protein from an acid-methanol extract of diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.

SAWADA H., NAKAGOSHI M., YAMAMOTO T., KATO T., MASE K., YAMAMOTO T., IZUMI S.

Biol. Lab., Center for Natural Science, Kitasato University, Kitasato 1-15-1, Sagamihara, Kanagawa 2288555, Japan.

2002 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 71(3), 103-108. (E)

Pin peptide, corresponding to fragments of egg-specific protein, interacts with EA4 to inhibit deglycosylation by PNGase F.

TANI N., ISOBE M., KAI H.

Ins. Bio. and Biotech., Dpt of Biochem. and Biotech., United G. S. of Agric. S., Tottori Univ., Koyama, Tottori 6808553

2002 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 71(3), 97-102. (E)

Multiple and partial correlation of traits characterizing the partenogenetic development of silkworm.

VASSILEVA J., TSENOV P.

Institute of Animal Sciences - Experimental Base Vratsa.

2002 Journal of Animal Science, Vol. XXXIX(2), 34-37. (B,e)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Dynamic light scattering of native silk fibroin solution extracted from different parts of the middle division of the silk gland of the *Bombyx mori* silkworm.

HOSSAIN K.S., OCHI A., OYAMA E., MAGOSHI J., NEMOTO N.

Department of Molecular and Material Sciences, IGSES, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan.

2003 Biomacromolecules, Vol. 4(2), 350-359. (E)

Antioxidant in the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*.

KURIOKA A., YAMAZAKI M.

Silk Sciences Research Institute, Hyakunincho 3-25-1, Shinjuku, Tokyo 169-0073, Japan;

2002 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 71(3), 177-180. (E)

Antigenotoxicity of peptides produced from silk fibroin.

PARK K.J., JIN H.H., HYUN C.K.

2002 Process Biochem., Vol. 38(3), 411-418.

From EST sequence to spider silk spinning : identification and molecular characterisation of *Nephila senegalensis* major ampullate gland peroxidase NsPox.

POUCHKINA N.N., STANCHEV B.S., MCQUEEN-MASON S.J.

Centre for Novel Agricultural Products (CNAP), Dpt of Biology, University of York, YO10 5YW, York, UK.

2003 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 33(2), 229-238. (E)

Study on fibroin heavy chain of the silkworm *Bombyx mori* by fluorescence in situ hybridization (FISH).

SONG F.Z., ZHANG P.B., YI F.P., HONG X.J., LU C., BANNO Y., FUJII H., KOGA K.

2002 Life Sciences, Vol. 45(6), 663-668.

Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*.

TAKASU Y., YAMADA H., TSUBOUCHI K.

National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2002 Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 66(12), 2715-2718. (E)

Extraction and chromatographic analysis of cocoon sericin of the silkworm, *Bombyx mori*.

TAKASU Y., YAMADA H., TSUBOUCHI K.

National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2002 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 71(3), 151-156. (E)

Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons.

TOMITA M., *et al.*

Hiroshima T. Regen. Proj., Japan Sci. and Tech. Corpo., 3-10-32, Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

2003 Nature Biotechnol., Vol. 21(1), 52-56. (E)

Ultrastructure of the excretory duct in the silk gland of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae).

VICTORIANO É., GREGORIO E.A.

2002 Arthropod Structure and Development, Vol. 31(1), 15-21.

The structural characteristics of *Bombyx mori* silk fibroin before spinning as studied with molecular dynamics simulation.

YAMANE T., UMEMURA K., ASAKURA T.

2002 Macromolecules, Vol. 35(23), 8831-8838.

Soie

Silk

¹³C-CP/MAS NMR study on structural heterogeneity in *Bombyx mori* silk fiber and their generation by stretching.

ASAKURA T., YAO J.M.

2002 Protein Science, Vol. 11(11), 2706-2713.

The Molecular structure of spider dragline silk : folding and orientation of the protein backbone.

BEEK J.D., HESS S., VOLRATH F., MEIER B.H.

2002 Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 99(16), 10266-10271.

Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved fourier transform infrared spectroscopy : effect of potassium ions on *Nephila spidroin* films.

CHEN X., KNIGHT D.P., SHAO Z., VOLLRATH F.

Dpt of Macro. S., The K. Lab. of Mol. Engi. of P. of Educ. M., Fudan Univ., Shanghai 200433, Republic of China.

2002 Biochemistry, Vol. 41(50), 14944-14950. (E)

Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy: effect of potassium ions on *Nephila spidroin* films.

CHEN X., KNIGHT D.P., SHAO Z.Z., VOLLRATH F.

2002 Biochemistry, Vol. 40(50a), 14944-14950.

Silk fibroin/poly(carbonate)-urethane as a substrate for cell growth : in vitro interactions with human cells.

CHIARINI A., PETRINI P., BOZZINI S., PRA I.D., ARMATO U.

Department of Biomedical & Surgical Sciences, Histology & Embryology Unit, Verona, Italy.

2003 Biomaterials, Vol. 24(5), 789-799. (E)

Comparative architecture of silks, fibrous proteins and their encoding genes in insects and spiders.

CRAIG C.L., RIEKEL C.

Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA, USA.

2002 Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., Vol. 133(4), 493-507. (E)

Swelling behavior of a genetically engineered silk elastin like protein polymer hydrogel.

DINERMAN A.A., CAPPELLO J., GHANDEHARI H., HOAG S.W.

2002 Biomaterials, Vol. 23(21), 4203-4210.

Grafting of 2-vinyl-4,4-dimethylazlactone onto electron-beam activated poly(propylene) films and fabrics. Application to the immobilization of sericin.

FONTAINE L., LEMELE T., BROSSE J.C., SENNYEY G., SENET J.P., WATTIEZ D.

2002 *Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 203(10/11), 1377-1384.

Genetic engineering of fibrous proteins: spider dragline silk and collagen.

FOO C.W.P., KAPLAN D.L.

2002 *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 54(8), 1131-1143.

Acid hydrolysis of silk fibroins and determination of the enrichment of isotopically labeled amino acids using precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry.

HESS S., VAN BEEK J., PANNELL L.K.

S. Mass Spect. F., Nat. Inst. of Diab. and Digest. and Kidney Dis., Nat. Inst. of Health, Bldg 8, Rm B2A27, MD, USA.

2002 *Anal Biochem.*, Vol. 311(1), 19-26. (E)

Studies on composite fibers produced from fibroin of wild silkmoths and cellulose.

IWAOKA M., KANEKATSU R., LIZUKA E., YAJIMA M., SHIRAI K., KIGUCHI K.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda-shi, Nagano-Ken 3868567, Japan.

2002 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 71(3), 157-160. (E)

Dyeing property of chitosan-treated tussah silk fabric dyed with azoic dyes.

KAKO T., NABESHIMA A.

2002 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 71(3), 147-151. (J)

Determination of distance of intra-molecular hydrogen bonding in (Ala-Gly) (15) with silk I form after removal of the effect of MAS frequency in REDOR experiment.

KAMEDA T., ZHAO C., ASHIDA J., ASAKURA T.

Department of Biotech., Tokyo Univ. of Agric. and Tech., Koganei 184-8588, Tokyo, Japan.

2003 *J. Magn. Reson.*, Vol. 160(2), 91-96. (E)

Dyeing of silk with mononitrocinic acid triazine reactive dyes.

KATO H., HATA T.

Insect Biotech. and Seric. Dept., National Inst of Agrobiol. Sci., Oowashi 1-2, Tsukuba 305-8634, Japan.

2002 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 71(3), 161-166. (E)

Transgenic spider silk.

KNOLL M., ZOSIMO LANDOLFO G.

2002 *Biofutur*, Vol. 224, 40-41.

Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets.

LI M., OGISO M., MINOURA N.

2003 *Biomaterials*, Vol. 24(2), 357-365.

Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery.

MEGEED Z., CAPPELLO J., GHANDEHARI H.

2002 *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 54(8), 1075.

Visco-elastic properties of cartilage tissue regenerated with fibroin sponge.

MORITA Y., TOMITA N., AOKI H., WAKITANI S., TAMADA Y., SUGURO T., IBEUCHI K.
Institute for Frontier Medical Sci., Kyoto Univ., 53 Kawahara-cho, Shongoin, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8507, Japan.

2002 *Biomed Mater Eng.*, Vol. 12(3), 291-298. (E)

Regenerated silk fibroin films : thermal and dynamic mechanical analysis.

MOTTA A., FAMBRI L., MIGLIARESI C.

2002 *Macromolecular Chem. and Phys.*, Vol. 203(10-11), 1658-1665.

Dyeing of silk with a new naphthazarin pigment.

NAGASHIMA N., YAMAMOTO Y., KINOSHITA Y., OGASAWARA S., KATAYAMA A.
Faculty of Home Economics, Tokyo Kasei University, Kaga 1-18-1, Itabashi-ku,
Tokyo 173-8062, Japan.

2002 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 71(3), 141-146. (J,e)

Heterogeneous exchange behavior of *Samia cynthia ricini* silk fibroin during helix-coil transition studied with C-13 NMR.

NAKAZAWA Y., ASAKURA T.

2002 *FEBS Letters*, Vol. 529(2-3), 188-192.

Mechanical properties of silk fibroin-microcrystalline cellulose composite films.

NOISHIKI Y., NISHIYAMA Y., WADA M., KUGA S., MAGOSHI J.

2002 *J. Applied Polymer Science*, Vol. 83(13), 3425-3429.

Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*.

PEREIRA-MOURIES L., et al.

2002 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 269(20), 4994-5003.

Physical properties of silk fabric treated with glyoxal resin.

PRATIBHA SHARMA, MANISHA GAHLOT

Dpt of Clothing and Textiles, G.B. Pant Univ. of Agriculture and Technology, Pantnagar, Uttaranchal,
India.

2003 *Indian Silk*, Vol. 41(10), 20-22. (E)

Preparation of silk fibroin-supported Pd(0) catalyst for chemoselective hydrogenation: reduction of palladium(II) acetate by methanol on the protein.

SAJIKI H., IKAWA T., YAMADA H., TSUBOUCHI K., HIROTA K.

2003 *Tetrahedron Lett.*, Vol. 44(1), 171-174. (E)

Analysis of structure/property relationships in silkworm (*Bombyx mori*) and spider dragline (*Nephila edulis*) silks using Raman spectroscopy.

SIRICHAISIT J., BROOKES V.L., YOUNG R.J., VOLLRATH F.

Manchester Materials Science Centre, UMIST/University of Manchester, Grosvenor Street,
Manchester M1 7HS, U.K.

2003 *Biomacromolecules*, Vol. 4(2), 387-394. (E)

Thermal properties of *Bombyx mori* and several wild silkworm silks. Phase transition of liquid silk.

TANAKA T., et al.

2002 *J. Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 70(3), 852-853. (E)

Production of antimicrobially active silk proteins by use of metal-containing dyestuffs.

TSUKADA M., KATOH H., WILSON D., SHIN B.S., ARAI T., MURAKAMI R., FREDDI G.
 2002 *J. Applied Polymer Science*, Vol. 86(5), 1181-1188.

Structural characteristics and properties of silk fibroin/polyurethane blend films.

UM C.I., KWEON H.Y., HWANG C.M., MIN B.G., PARK Y.H.
 Department of Natural Fiber Sciences, Seoul National University, Suwon 441744, Korea.
 2002 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 5(2), 163-170. (E)

Genetic engineering of fibrous proteins : spider dragline silk and collagen.

WONG PO FOO C., KAPLAN D.
 2002 *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 54(8), 1131.

Application of silks as scaffolds for three-dimensional culture of chondrocytes.

WU H.T., ZHONG C.P., GU Y.D.
 Dpt of Otorhinolaryngology, EENT Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai,
 P.R. China 200031.
 2000 *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, Vol. 14(5), 301-304. (C,e)

Structure and microporous formation of cellulose/silk fibroin blend membranes. Part II. Effect of post-treatment by alkali.

YANG G., ZHANG L.N., CAO X.D., LIU Y.G.
 2002 *J. Membrane Science*, Vol. 210(2), 379-387.

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 (4^{ème} 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 edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *