

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

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)
HE K. (Chine / *China*)
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)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE – CONTENTS

Statistiques 2002 / Statistics 2002 i

Articles scientifiques / Scientific papers

- Electrophoretic analysis of non-specific haemolymph esterases during silkworm (*Bombyx mori* L.) ontogenesis** 153
 Analyse électrophorétique des estérases de l'hémolymph au cours de l'ontogénèse chez le ver à soie *Bombyx mori* L. 163
 TEODORA STOYKOVA, PETAR POPOV & BOJAN DIMITROV

- Aerodynamic parameters and design of flight surface of the silkworm pest *Exorista sorbillans* Wiedemann (Diptera : Tachinidae)** 167
 Paramètres aérodynamiques et conception de la surface de vol du parasite du ver à soie *Exorista sorbillans* Wiedemann (Diptera : Tachinidae) 175
 S. SUGNANA KUMARI, U. SURYANARAYANA MURTY, ADEEL AHMED & A. RADHAKRISHNA

Rapport techniques / Technical reports

- Screening of silkworm (*Bombyx mori*) germplasm for resistance to *Bombyx mori* denonucleosis virus 1 (BmDNV1)** 179
 Evaluation de la résistance des lignées de ver à soie *Bombyx mori* au virus 1 de la denonucleose (BmDNV1) 187
 V. SIVAPRASAD, CHANDRASHEKHARAI AH, C. RAMESH, S. S. KUMARI, C. R. REDDY, S. V. SESHAGIRI & D. VINEELA

- The effect of "Seri guard" on rearing performance and loss due to diseases in silkworm, *Bombyx mori* L.** 191
 Effet du "Seri guard" sur la performance d'élevage et la perte due aux maladies chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. 199
 P. VENKATARAMANA, N. SURYANARAYANA & R. K. DUTTA

- The cross infectivity between pathogens of silkworm, *Bombyx mori* L. and mulberry leaf roller, *Diaphania pulverulentalis* (Hampson)** 203
 Infectiosité croisée des pathogènes du ver à soie *Bombyx mori* L. et de ceux de l'enrouleur de la feuille de mûrier *Diaphania pulverulentalis* (Hampson) 211
 S. D. SHARMA, K. CHANDRASEKHARAN, B. NATARAJU, ...
 M. BALAVENKATASUBBAIAH, T. SELVAKUMAR, V. THIAGARAJAN & S. B. DANDIN

- Studies on bivoltine cocoon cooking – Part I : Effect of retting temperature and permeation treatment condition on reeling performance of Indian bivoltine hybrid cocoons** 215
 Etudes sur la cuisson des cocons bivoltins – Première partie : Effet de la température de rouissage et des conditions du traitement d'imprégnation sur le dévidage de cocons hybrides bivoltins indiens 227
 SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR

Studies on bivoltine cocoon cooking – Part II : Effect of retting temperature and permeation treatment condition on quality characteristics of raw silk of Indian bivoltine hybrid cocoons	235
Etudes sur la cuisson des cocons bivoltins - Deuxième partie : Effet de la température de rouissage et des conditions du traitement d'imprégnation sur les caractéristiques de qualité de la soie grège de cocons hybrides bivoltins indiens	
SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR	245

Variations in biochemical constituents in relation to maturity of leaves among seven mulberry varieties	251
Variations des constituants biochimiques en fonction de la maturité des feuilles chez sept variétés de mûrier	
U. S. P. SINHA, K. NEOG, G. RAJKHOWA & R. CHAKARVORTY	259

Studies on the impact of infestation of leaf roller, <i>Diaphania pulverulentalis</i> (Hampson) (Lepidoptera : Pyralidae) on growth and yield of mulberry	263
Impact de l'infestation par l'enrouleur de la feuille, <i>Diaphania pulverulentalis</i> (Hampson) (Lepidoptera : Pyralidae) sur la croissance et le rendement du mûrier	
S. RAJADURAI, M. MAHENDRA, R. L. KATYAR & VINEET KUMAR	271

Biochemical responses of mulberry genotypes to NaCl salinity	277
Réponses biochimiques de génotypes de mûrier à la salinité	
S. SHAIK MOHAMED ANAS & M. VIVEKANANDAN	301

Sulphur uptake in three varieties of mulberry (<i>Morus indica</i> L) under irrigated condition	307
Absorption du soufre chez trois variétés de mûrier (<i>Morus indica</i> L.) en culture irriguée	
R. M. SHIVAPRAKASH & U. D. BONGALE	315

Note brève / Brief note

Susceptibility of CSR hybrids of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L. to two species of <i>Aspergillus</i> fungi	319
Sensibilité des vers à soie <i>Bombyx mori</i> L. hybrides du CSR à deux espèces de champignons <i>Aspergillus</i>	
G. P. SINGH, T. SELVAKUMAR, S. D. SHARMA, B. NATARAJU & R. K. DATTA	325

Statistiques 2002 - 2002 Statistics

Tableau I. Production de cocons et de soie grège en 2002.

Table I. 2002 cocoon and raw silk production.

Pays Country	Cocons frais Fresh cocoons (tonnes)	Soie grège Raw silk (tonnes)
Brésil / <i>Brazil</i> ⁽¹⁾	10 238	1 607
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	50	7
Chine / <i>China</i>	560 000 ⁽²⁾	64 000 ⁽³⁾
Colombie / <i>Colombia</i>	35	0
Egypte / <i>Egypt</i>	14	2
Grèce / <i>Greece</i>	60	4
Inde / <i>India</i> ⁽⁴⁾	141 155 ⁽⁵⁾	17 351 ⁽⁶⁾
Indonésie / <i>Indonesia</i>	691	91
Iran	3 500	630
Japon / <i>Japan</i>	880	391
Madagascar	106 ⁽⁷⁾	-
Philippines	28	3
Roumanie / <i>Romania</i>	3	0
Thaïlande / <i>Thailand</i>	-	1 500
Turquie / <i>Turkey</i>	100	17
Vietnam	21 000 ⁽⁸⁾	2 450 ⁽⁹⁾

- Non disponible / *Not available.*

(1) 2001 / 2002.

(2) dont 40 000 tonnes non mûrier / *including 40 000 tons non mulberry.*

(3) dont 4 000 tonnes non mûrier / *including 4 000 tons non mulberry.*

(4) avril 2001 / mars 2002 / *April 2001 / March 2002.*

(5) dont 1 539 tonnes de cocons eri / *including 1 539 tons eri cocoons.*

(6) dont 1 509 tonnes non mûrier / *including 1 509 tons non mulberry.*

(7) dont 40 tonnes non mûrier / *including 40 tons non mulberry.*

(8) dont 1 000 tonnes non mûrier / *including 1 000 tons non mulberry.*

(9) dont 200 tonnes non mûrier / *including 200 tons non mulberry.*

Tableau II. Exportations et importations de cocons et de soie grège en 2002.**Table II. 2002 cocoon and raw silk imports and exports.**

Pays	Exportation de cocons secs	Exportation de soie grège	Importation de cocons secs	Importation de soie grège
Country	Dry cocoon exports (tonnes)	Raw silk exports (tonnes)	Dry cocoon imports (tonnes)	Raw silk imports (tonnes)
Brésil / Brazil	220	1 415	-	30
Bulgarie / Bulgaria	0	0	0	0
Chine / China	254	14 701 ⁽¹⁾	655	320 ⁽²⁾
Colombie / Colombia	0	0	0	0
Egypte / Egypt	0	0	0	1
Grèce / Greece	0	0	0	-
Inde / India	11	159 ⁽³⁾	2	6 809 ⁽⁴⁾
Italie / Italy	0	506	-	2 363
Japon / Japan	9	2	264	2 024 ⁽⁵⁾
Philippines	0	0	0	63
Roumanie / Rumania	0	0	0	0
Thaïlande / Thailand	-	16	7	234
Turquie / Turkey	0	0	-	-
Vietnam	-	2 000 ⁽⁶⁾	0	900

- Non disponible / Not available.

(1) dont 3 128 tonnes non mûrier / including 3 128 tons non mulberry.

(2) dont 117 tonnes non mûrier / including 117 tons non mulberry.

(3) dont 51 tonnes non mûrier / including 51 tons non mulberry.

(4) dont 1 486 tonnes non mûrier / including 1 486 tons non mulberry.

(5) dont 78 tonnes non mûrier / including 78 tons non mulberry.

(6) dont 100 tonnes non mûrier / including 100 tons non mulberry.

Tableau III. Prix moyens du kilogramme de cocons en dollars américains en 2002.

Table III. Average prices for 1 kg cocoons in US dollar in 2002.

Pays	Prix payé aux producteurs (cocons frais)	Prix à l'exportation (cocons secs)	Prix à l'importation (cocons secs)
<i>Country</i>	<i>Price paid to producers (fresh cocoons)</i>	<i>Export price (dry cocoons)</i>	<i>Import price (dry cocoons)</i>
Brésil / <i>Brazil</i>	1.8	4.7	-
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	2.5	xx	xx
Chine / <i>China</i>	1.3	6.5	1.4
Colombie / <i>Colombia</i>	2.1	xx	xx
Egypte / <i>Egypt</i>	3.2	xx	-
Grèce / <i>Greece</i>	2.5	xx	xx
Inde / <i>India</i>	2.5	-	-
Iran	2.7	-	-
Japon / <i>Japan</i>	15	6	6.3
Madagascar	6	-	-
Philippines	2.5	xx	xx
Roumanie / <i>Romania</i>	2	xx	xx
Thaïlande / <i>Thailand</i>	2	7	5
Turquie / <i>Turkey</i>	5	xx	-
Vietnam	1.5	-	-

- Non disponible / *Not available.*

xx : Pas d'exportation / d'importation de cocons.

No cocoon export / import.

ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF NON-SPECIFIC HAEMOLYMPH ESTERASES DURING SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) ONTOGENESIS

TEODORA STOYKOVA¹, PETAR POPOV¹ & BOJAN DIMITROV²

1. Department of Genetics, University of Plovdiv, Plovdiv 4000, Bulgaria

2. Institute of Genetics, Sofia 1113, Bulgaria.

*The non-specific esterases from larvae, pupae and adults of sixteen races and eight interracial F1 hybrids of the silkworm (*Bombyx mori* L.) kept in Bulgaria were studied. Ten fractions of esterase activity were visualised by electrophoresis in polyacrylamide gels. The data obtained show that the enzymes are controlled by five loci: *Bes A*, *Bes B*, *Bes C*, *Bes D* and *Bes E*. Stage specific expression was established. Diallele and triallele polymorphism at four of the loci was observed. The frequency of alleles at the polymorphic loci, the degree of polymorphism and heterozygosity show the race specificity. Race specific expression at some of the esterase loci was also observed.*

Keywords: *Bombyx mori* L., electrophoresis, haemolymph esterases, polymorphism.

INTRODUCTION

Haemolymph esterase spectrum in some silkworm organs has been studied for many years (Eguchi *et al.*, 1965; Eguchi and Yoshitake 1966; Eguchi and Yoshitake 1967; Yoshitake *et al.*, 1966; Egorova *et al.*, 1977). Races of various origin and location have been characterised by different electrophoretic techniques (Eguchi and Sugimoto, 1965; Yoshitake, 1970; Konicheva *et al.*, 1979; Egorova *et al.*, 1985; Shabalina 1990). However, the experimental data and the interpretation of the authors vary considerably (Eguchi *et al.*, 1965; Eguchi and Yoshitake, 1966; Egorova *et al.*, 1985; Shabalina 1990; He 1995). Moreover, genetic interpretation of esterase electrophoretic spectra is missing in most of the publications known (Eguchi and Iwamoto 1975; Kai and Hasegawa, 1972; Minina and Phillippovich 1974a; Minina and Phillippovich 1974b; Egorova *et al.*, 1977; Konicheva *et al.*, 1977; Krishnamurthy *et al.*, 1984; Kutuzova *et al.*, 1985; Xu and Song 1987). The races kept in Bulgaria have not been studied yet in relation to the expression and polymorphism at the esterase loci. Therefore the study of the esterase spectrum specificity, polymorphism and their expression during ontogenesis in Bulgarian strains is a reason for our investigations.

MATERIAL AND METHODS

As a total 1200 specimens of sixteen races kept in Bulgaria and designated as P14, P15, 19, 20, B517, T106, T108, M1, M2, UK17, UK18, UK19, UK20, Tashkent 12, Tashkent15 and Tashkent 16 as well as the interracial F1 hybrids P14×P15, P15×P14, M1×M2, M2×M1, UK17×UK19, UK19×UK17, UK18×UK20 and UK20×UK18 were studied. The races P14, P15, 19 and 20 were obtained in Bulgaria and the rest were introduced. The race B517 is polyvoltine and of low productivity, while all others are monovoltine and highly productive. Specimens were selected from different families of each race including reciprocal hybrids. Haemolymph esterase spectra were

analysed at various stages of silkworm development (larva – 1st to 5th instar, spinning larva, pupa 1st – 2nd day, 5th – 6th day, 8th – 10th day and imago). Samples were taken from separate specimens or from a pool of 20 specimens because of the limited haemolymph amount at 1st and 2nd larva instar. At all other ontogenetic samples were taken from a single specimen only. The sex at the stages 4th larva instar – imago was also recorded.

The haemolymph was obtained by pricking with a pin one of larva abdominal legs or the thorax of the pupa or imago. 0.8M tris-phosphate buffer at pH 6.7 was added to the samples and 10µl of each sample was applied into the gel. The electrophoresis was conducted in 6% and 7.5% polyacrylamide vertical gels, pH 8.9 at 4° C and 4.5 mA/cm for 3h. 3.3% polyacrylamide concentrating gels at pH 6.7 and 0.05M tris-0.2M glycine electrode buffer at pH 8.3 were used. The nonspecific esterases were visualised in 1M phosphate buffer at pH 7.0. A mixture of α - and β -naphthylacetate was used as substrate and Fast blue BB salt as a dye. The stained plates were fixed in a 14% trichloroacetic acid for 2 hours and stored in 7% acetic acid.

The degree of polymorphism (P) and heterozygosity (H) were calculated after Ayala and Kiger (1987).

RESULTS

Electrophoretic spectra of the esterases detected in silkworm races and F1 hybrids suggest that there are no considerable differences in the fraction number and intensity of staining dependent on the gel concentration. In the haemolymph of all races and hybrids, 10 fractions of esterase activity were detected at various ontogenetic stages. These were situated in 5 zones (Fig. 1, 2). Differences in the number and intensity of the esterase bands were observed during the period from the 1st instar to imago. Only one band of esterase activity – BES A was detected in some haemolymph samples taken from larvae at 1st and 2nd instar. Besides this fraction, in mixed samples, i.e. obtained from several specimens in the same period of ontogenesis, weak esterase bands were observed in the following zones: B and C – in race B517; and in B, C and D – in all other races. The lack of these bands in the individual spectra of the 1st and 2nd instar larva is thought to be caused by low esterase concentration. The esterase bands of the 1st, 2nd and 3rd instar larvae were poorly stained with the exception of BES A.

BES A is the most intensively stained band in all silkworm races and hybrids at all stages studied.

In certain haemolymph samples from larvae of all races (but T108) and hybrids at all ontogenetic stages except for 8th–10th day pupae and imagos the bands BES B1 and BES B2 were present either separately or together (Fig. 1, 2, 3, 4). Only BES B2 were detected in T108.

Very strong esterase bands – BES C2 were observed in the zone C at all ontogenetic stages in the race B517 (Fig. 1, 3). In the remaining races and their hybrids these bands were very weak and were neither visible at the end of the last larval stage nor at the beginning of the pupa stage (Fig. 2). The bands BES C1, BES C2 and BES C3 were present in pairs or separately in the individual spectrum of haemolymph from races M2, UK17 and UK19. BES C1 and BES C2 or BES C2 and BES C3 in single specimens were visualised either in combinations or separately in this zone in the esterase spectra of the races UK20, Taskent12 and M1, UK18, Taskent15 (Fig. 2, 3). Only the bands BES C1 or BES C2 were detected in all other races. Only BES C2 were present in the hybrids.

Esterase activity was detected in the zone D in all races and their hybrids tested throughout all ontogenetic stages. In the race B517 spectrum this activity was not observed before 3rd larva instar (Fig. 1). The bands BES D1, BES D2 and BES D3 could be seen either in pairs or separately in the haemolymph spectrum of larvae, pupae and adults from races T106, M1, UK17, UK19, Taskent16 and hybrids UK17 × UK19 and UK19 × UK17 (Fig. 2, 3, 4). BES D1 and BES D2 bands were also observed in pairs or separately in samples from 19, 20, M2, Tashkent12 and Tashkent15 races as well as in F1 P14 × P15, P15 × P14, M1 × M2, M2 × M1, UK18 × UK20 and UK20 × UK18 hybrids (Fig. 2).

BES D1 and BES D3 were visualised in B517 and T108 (Fig. 1, 2, 4). Only BES D1 fraction was present in the spectrum of the race P15, UK20 and BES D2 in that of P14, UK18 (Fig. 2, 4).

A single band was detected in the zone E – BES E1 in some specimens from the races 19, M1, M2 and Tashkent15 as well as in F1 hybrid M1×M2 and M2×M1 in haemolymph from 3rd larval instar to imago (Fig. 2).

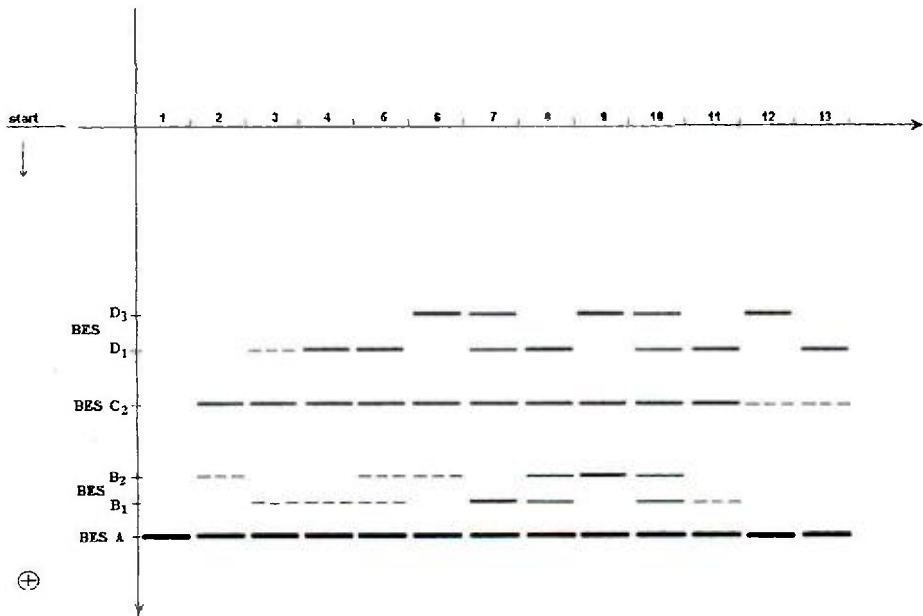


Fig. 1. Esterase spectra of silkworm haemolymph in PAGE (polyvoltine race B517):

1, 2 – 1st and 2nd larval instar; 3 – 3rd larval instar; 4-6 – 4th larval instar; 7-5th larval instar 1st-4th day; 8 – 5th larval instar 5th – 8th day; 9 – spinning period; 10- pupae 1st-2nd day; 11- pupae 5th-6th day; 12- pupae 8th-10th day; 13- adults; 2-mixed probe; 1, 3-13 individual probes.

Fig 1. Spectre estérases de l'hémolymph du ver à soie après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (race polyvoltine B517):

1, 2 – 1^{er} et 2^{ème} âge larvaire ; 3 – 3^{ème} âge larvaire ; 4-6 – 4^{ème} âge larvaire ; 7-5^{ème} âge larvaire 1^{er} au 4^{ème} jour ; 8 – 5^{ème} âge larvaire 5^{ème} au 8^{ème} jour ; 9 – période de filage ; 10 – nymphes 1^{er} au 2^{ème} jour ; 11 – nymphes 5^{ème} au 6^{ème} jour ; 12 – nymphes 8^{ème} au 10^{ème} jour ; 13 – adultes ; 2 – essais mélangés ; 1, 3-13 – essais individuels.

(Bes B1/Bes B1 – 3, 4, 7, 11; Bes B2/Bes B2 – 6, 9; Bes B1/Bes B2 – 5, 8, 10; Bes C2/Bes C2 – 3-13; Bes D1/Bes D1 – 3-5, 8, 11, 13; Bes D3/Bes D3 – 6, 9, 12; Bes D1/Bes D3 – 7, 10.)

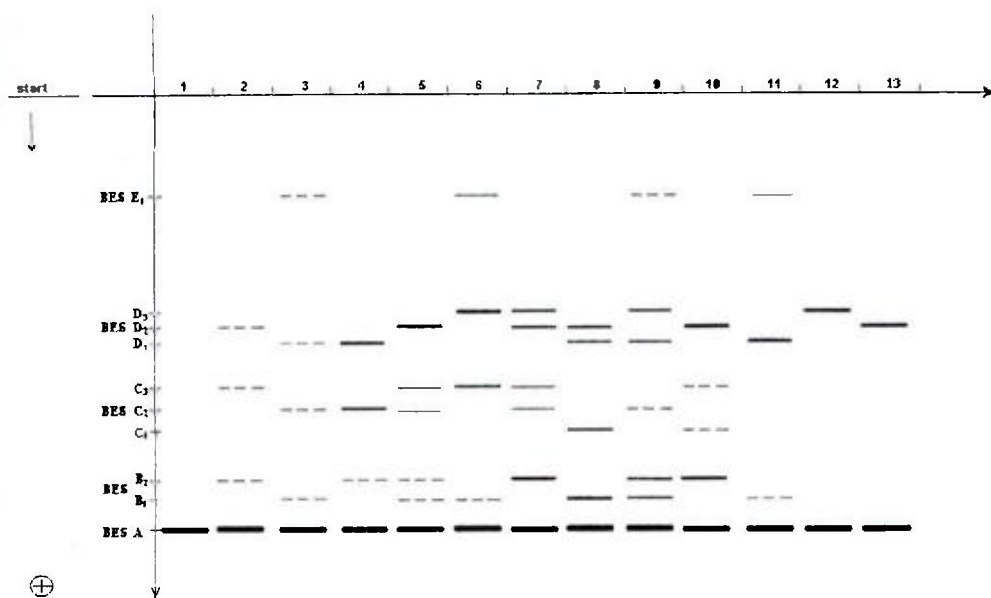


Fig 2. Esterase spectra of silkworm haemolymph in PAGE (monovoltine races and their hybrids).

1, 2 – 1st and 2nd larval instar; 3 – 3rd larval instar; 4-6 – 4th larval instar; 7 – 5th larval instar 1st-4th day; 8- 5th larval instar 5th- 8th day; 9 – spinning period; 10 – pupae 1st-2nd day; 11 – pupae 5th-6th day; 12- pupae 8th-10th day; 13 – adults; 2 – mixed probe; 1, 3-13 – individual probes.

Fig. 2. Spectre estérases de l'hémolymph du ver à soie après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (races monovoltines et leurs hybrides) :

1, 2 – 1^{er} et 2^{ème} âge larvaire ; 3 – 3^{ème} âge larvaire ; 4-6 – 4^{ème} âge larvaire ; 7 – 5^{ème} âge larvaire 1^{er} au 4^{ème} jour ; 8 – 5^{ème} âge larvaire 5^{ème} au 8^{ème} jour ; 9 – période de filage ; 10 – nymphes 1^{er} au 2^{ème} jour ; 11 – nymphes 5^{ème} – 6^{ème} jour ; 12 – nymphes 8^{ème} – 10^{ème} jour ; 13 – adultes ; 2 – essai mélangé ; 1, 3-13 – essais individuels.

(Bes B1/Bes B1 – 3, 6, 8, 11; Bes B2/Bes B2 – 4, 7, 10; Bes B1/Bes B2 – 5, 9; Bes C1/Bes C1 – 8, 10; Bes C2/Bes C2 – 3, 4, 9; Bes C3/Bes C3 – 6; Bes C2/Bes C3 – 5, 7; Bes C1/Bes C3 – 10; Bes D1/ Bes D1 – 3, 4, 11; Bes D2/Bes D2 – 5, 10, 13; Bes D3/ Bes D3 – 6, 12; Bes D1/Bes D2 – 8; Bes D2/Bes D3 – 7; Bes D1/Bes D3 – 9; Bes Eo/Bes Eo – 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13; Bes E1/Bes E1 – 6, 11; Bes Eo/Bes E1 – 3, 9).

No sex related differences were detected in the esterase spectra of the specimens tested.

In some PAGE plates "yellow" bands were observed over the BES E1 in the haemolymph from the 4th larval instar to imago. They were not distinguished from esterase bands very clearly by documental (black-white) photography. These fractions however were not stained in red-brown colour, which is typical for non-specific esterases. That is the reason why they were not discussed. Storage proteins (SP1 and SP2) were visualised in the same zone (unpublished data).

DISCUSSION

Polygenic control of *Bombyx mori* L. haemolymph esterases is reported by some authors (Egorova *et al.*, 1985; Shabalina, 1990; He 1995). He (1995) described polymorphism with a "deletion" type esterase – BesAo in some races and hybrids bred in China. The detected cholinesterase A corresponds to BES A identified in our work as the intensive band in the samples taken from all specimens at all

stages of ontogenesis. This finding implies that the Bes A locus in the races and hybrids tested is monomorphic. Our data are not consistent with those of Egorova *et al.*, (1985) and Shabalina (1990) who reported codominant biallele system at the Es I locus, which corresponds to the Bes I locus. The difference is probably due to the different origin of the races studied.



Fig. 3. Esterase spectra of silkworm haemolymph in 7.5% PAGE.

5th larval instar 7th day (1), spinning period (2-4), pupae 1st–2nd day (6-14) and pupae 3rd day (5): 1-5 – B517; 6 – YK19; 7, 8 – M1; 9-14 – Tashkent 16.

Fig. 3. Spectre estérases de l'hémolymph du ver à soie après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 %.

5^{ème} âge larvaire (1), période de filage (2-4), nymphes 1^{ère}–2^{ème} jour (6-14) et nymphes 3^{ème} jour (5): 1-5 – B517; 6 – YK19; 7, 8 – M1; 9-14 – Tashkent 16.

(Bes B1/Bes B1 – 1-14; Bes C2/Bes C2 – 1-5, 7; Bes C2/Bes C3 – 8; Bes D1/Bes D1 – 6, 9-14; Bes D3/Bes D3 – 1-5; Bes D1/Bes D2 – 7; Bes D2/Bes D3 – 8; Bes Eo/Bes Eo – 1-14.)

Egorova *et al.*, (1985), Shabalina (1990) and He (1995) reported biallelic codominant polymorphism in esterase located of zone B in the races they studied. The localisation of BES B1 and BES B2 bands we observed in the esterase spectra of races P14, P15, 19, 20, B517, T106, M1, M2, UK17, UK18, UK19, UK20, Tashkent12, Tashkent15 and Tashkent16 as well as of their hybrids is in accordance with these findings. All specimens of race T108 are homozygous for the Bes B2 allele only. Both alleles Bes B1 and Bes B2 in homozygous and heterozygous genotypes were found in the other races (Table I).

There is no information in the available references about the presence of any esterase activity in the zone C of *B. mori* L. Three fractions were visualised in that zone. Their combined presence in some eletrophoretic spectra supports the hypothesis of a triallele codominant polymorphism. All three alleles of this locus were present in the gene pool of races M2, UK17 and UK19 (Table I). Genotypes homozygous or heterozygous for the alleles Bes C1 and Bes C2 were found in the races UK20 and Tashkent12. The Bes C2/Bes C2 homozygotes prevail quantitatively. This indicates that Bes C2 allele

frequency in the gene pool of the races is much higher than that of Bes C1 allele whilst Bes C3 allele is absent (Table I). Genotypes that are homozygous and heterozygous for the Bes C2 and Bes C3 alleles were present in M1, UK18 and Tashkent 15 races. Homozygotes of the Bes C3/Bes C3 type occur rarely, which is most probable due to a low frequency of the Bes C3 allele in the gene pool of these races. Our results show that the races 20, T106 and T108 are homozygous. They are of the Bes C1/Bes C1 type. The races P14, P15, 19, B517 and Tashkent16 as well as F1 hybrids are Bes C2/Bes C2 homozygotes. These data suggest that Bes C locus is monomorphic in the races P14, P15, 19, 20, B517, T106, T108 and Tashkent16 as well as F1 hybrids (Table I). The allele Bes C2 is present in the gene pool of the rest of the races at a highest frequency. The reasons causing the absence of data concerning esterase activity in the zone C observed by some authors are not clear enough (Egorova *et al.*, 1985; Shabalina 1990; He 1995). One of the probable explanations might be the limited incidence of the Bes C locus products observed only during some ontogenetic stages.

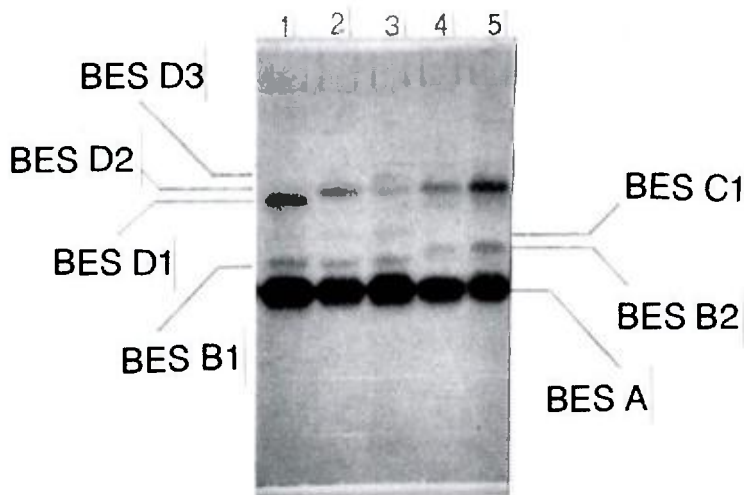


Fig. 4. Esterase spectra of silkworm haemolymph in 7.5% PAGE. pupae 5th-6th day:
1 – YK17; 2, 3 – YK19; 4, 5 – YK18.

Fig. 4. Spectre estérases de l'hémolymph du ver à soie après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 %, nymphes 5^{ème} – 6^{ème} jour :
1 – YK17; 2, 3 – YK19; 4, 5 YK18.

(Bes B1/Bes B1 – 1-3; Bes B2/Bes B2 – 4, 5; Bes D1/ Bes D1 – 1; Bes D2/ Bes D2 – 2, 4, 5; Bes D2/Bes D3-3; Bes Eo/Bes Eo – 1-5)

Egorova *et al.* (1985) observed monomorphism of some fractions located in a zone corresponding to that designated by us as "D". Shabalina (1990) described products of biallele codominant polymorphism in the same zone and proposed the existence of a third allele ("null"). He (1995) reported triallele polymorphism at an analogous locus. In our study three fractions were detected in the zone D. Their combination in separate spectra reveals triallele codominant polymorphism. The latter is in agreement with the findings of He (1995). All three alleles of this locus were present in the gene pool of races T106, M1, UK17, UK19, Tashkent16 and hybrids UK17×UK19 and UK19×UK17 (Table I). The alleles Bes D1 and Bes D2 combined in the homozygous and heterozygous genotypes were found in the gene pool of races 19, 20, M2, Tashkent 12 and Tashkent15 races as well as in those of the F1 P14×P15, P15×P14, M1×M2, M2×M1, UK18×UK20 and

UK20×UK18 hybrids. The alleles Bes D1 and Bes D3 were present in the gene pool of races B517 and T108 (Table I). The races P15 and UK20 are homozygous for Bes D1 allele while P14 and UK18 are homozygous for Bes D2 allele.

Table I. Allele frequencies at polymorphic esterase loci in the studied races and hybrids *B. mori* L.

Tableau I. Fréquences des allèles aux loci polymorphiques des estérases chez les races et les hybrides de B. mori L. étudiés.

Race	Allele frequency / Fréquence des allèles									
	Bes B		Bes C			Bes D			Bes E	
	BesB1	BesB2	BesC1	BesC2	BesC3	BesD1	BesD2	BesD3	BesEo	BesE1
P14	0.16	0.84	0	1	0	0	1	0	1	0
P15	0.31	0.69	0	1	0	1	0	0	1	0
19	0.32	0.68	0	1	0	0.06	0.94	0	0.92	0.08
20	0.27	0.73	1	0	0	0.04	0.96	0	1	0
B517	0.47	0.53	0	1	0	0.43	0	0.57	1	0
T106	0.02	0.98	1	0	0	0.83	0.02	0.15	1	0
T108	0	1	1	0	0	0.85	0	0.15	1	0
M1	0.29	0.71	0	0.95	0.05	0.70	0.28	0.02	0.95	0.05
M2	0.80	0.2	0.04	0.85	0.11	0.25	0.75	0	0.55	0.45
UK17	0.51	0.49	0.03	0.90	0.07	0.59	0.24	0.17	1	0
UK18	0.31	0.69	0	0.92	0.08	0	1	0	1	0
UK19	0.77	0.23	0.025	0.775	0.20	0.44	0.37	0.19	1	0
UK20	0.70	0.30	0.11	0.89	0	1	0	0	1	0
Tashkent12	0.90	0.10	0.08	0.92	0	0.93	0.07	0	1	0
Tashkent15	0.30	0.70	0	0.69	0.31	0.22	0.78	0	0.97	0.03
Tashkent16	0.56	0.44	0	1	0	0.86	0.07	0.07	1	0

Hybrid	Allele frequency / Fréquence des allèles									
	Bes B		Bes C			Bes D			Bes E	
	BesB1	BesB2	BesC1	BesC2	BesC3	BesD1	BesD2	BesD3	BesEo	BesE1
P14×P15	0.50	0.50	0	1	0	0.625	0.375	0	1	0
P15×P14	0.10	0.90	0	1	0	0.60	0.40	0	1	0
M1×M2	0.57	0.43	0	1	0	0.29	0.71	0	0.77	0.23
M2×M1	0.30	0.70	0	1	0	0.75	0.25	0	0.42	0.58
UK17×UK19	0.60	0.40	0	1	0	0.05	0.70	0.25	1	0
UK19×UK17	0.75	0.25	0	1	0	0.19	0.63	0.18	1	0
UK18×UK20	0.60	0.40	0	1	0	0.50	0.50	0	1	0
UK20×UK18	0.50	0.50	0	1	0	0.50	0.50	0	1	0

Table II. Polymorphism (P) and heterozygosity (H) in the studied races and hybrids *B. mori* L.Tableau II. Polymorphisme (P) et hétérozygotie (H) chez les races et les hybrides de *B. mori* L. étudiés.

Race	Polymorphism P	H/ heterozygosity/ Hétérozygotie H	
	Polymorphisme P	H/observed H/ observée	H/ expected H/ attendue
P14	0.20	0.32	0.27
P15	0.20	0.39	0.43
19	0.60	0.173	0.233
20	0.40	0.275	0.235
B517	0.40	0.455	0.495
T106	0.40	0.101	0.164
T108	0.20	0.30	0.255
M1	0.80	0.234	0.257
M2	0.80	0.308	0.363
UK17	0.60	0.383	0.415
UK18	0.40	0.195	0.29
UK19	0.60	0.417	0.45
UK20	0.40	0.305	0.31
Tashkent12	0.60	0.093	0.153
Tashkent 15	0.80	0.222	0.313
Tashkent16	0.40	0.28	0.37

Hybrids/ Hybrides	P Polymorphism	H/ heterozygosity Hétérozygotie H	
	Polymorphisme P	H/observed H/observée	H/expected H/ attendue
P14×P15	0.40	0.875	0.485
P15×P14	0.40	0.45	0.33
M1×M2	0.60	0.397	0.417
M2×M1	0.60	0.217	0.428
UK17 × UK19	0.40	0.35	0.463
UK19 × UK17	0.40	0.438	0.458
UK18 × UK20	0.40	0.90	0.49
UK20 × UK18	0.40	1	0.50

Eguchi *et al.* (1965) observed "zero type esterase - 00" resulting from a "zero" allele which is typical of 20% of Chinese, Japanese and European races they studied. Egorova *et al.*, (1985), Shabalina (1990) and He (1995) did not detect esterase activity in the zone E of the electrophoretic spectra of the races tested. As our data indicate only one fraction is situated in that zone in the electrophoretic spectra of races 19, M1, M2 and Tashkent15 as well as in M1×M2 and M2×M1 hybrids. Its varying intensity and its absence from the spectra of individual specimens may indicate

the incidence of diallele polymorphism with a "null" allele (Bes Eo). The lack of this fraction in the electrophoretic spectra of the rest of the races and hybrids may be due to homozygosity for the "null" allele.

The results of our study suggest that the synthesis of the 10 esterase fractions occurring in the silkworm haemolymph is controlled by 5 esterase loci (Bes A, Bes B, Bes C, Bes D and Bes E). The electrophoretic analysis reveals differences in the frequency of alleles at the polymorph loci in the various races and hybrids studied (Table I).

The results of our study on the stage specific expression of the esterase loci are of particular interest. In the available references we did not find any data concerning variation in expression of esterase loci during silkworm ontogenetic development. The observed decrease of Bes B1 and Bes B2 in pupa haemolymph and their absence at the end of pupa and imago stage in the studied races and hybrids give ground to conclude that repression of the Bes B locus gene activity takes place at pupation. The products of Bes C gene were highly expressed and were detected at all ontogenetic stages in the race B517 only. In the other races and hybrids these products were missing or had poor activity. Konicheva *et al.*, (1977) concluded that esterase activity differences among the races result from the specificity of their metabolism. The results of our investigation suggest that they are rather genetically determined. Bes D locus is expressed at all ontogenetic stages of all hybrids and races but in B517, the locus products were not observed before third instar larva.

On the basis of the results presented here we determined the level of polymorphism and heterozygosity in each race and hybrid tested (Table II). The highest level of polymorphism was found in the races M1, M2 and Tashkent15. Races and hybrids studied are genetically heterogenic and differ in the allele frequency at the polymorphic esterase loci. In most of the races observed heterozygosity is lower than the theoretically expected one (Table II) which is due to purposeful crossings that result in gradual elimination of variation. The highest heterozygosity is found in the hybrid forms.

CONCLUSIONS

1. Five loci controlling non-specific esterases in silkworm (*B. mori* L.) haemolymph were identified.
2. Four of the loci were polymorphic. Two of them showed diallelic and two other showed triallelic polymorphism.
3. The race tested and their hybrids were heterogenic.
4. The frequency of alleles at the polymorphic loci, the degree of polymorphism and heterozygosity show race specificity.
5. A stage specific gene expression of the esterase loci was observed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by the National Foundation of Scientific Investigations (grant MU OBE 3/97).

REFERENCES

- AYALA F., KIGER J. (1987) Modern Genetics. Zemizdat, Sofia. 1031 (in Bulgarian).
- EGOROVA T., VASILLEVA L., SANKINA T., NASIRILLAIEV Y, PHILLIPPOVICH Y (1977) Enzymatic activity of soluble proteins in different silkworm races (*B. mori* L.). J. Gen. Biol. 3, 447-463 (in Russian).
- EGOROVA T., NALETOVA E., NASIRILLAIEV Y (1985) Polymorphic system of silkworm haemolymph esterases as a criterion to make programs for parental specimens crossing. Biochemistry of insects. M., 54-62 (in Russian).

- EGUCHI M., YOSHITAKE N., KAI H. (1965) Type and inheritance of blood esterase in the silkworm, *Bombyx mori* L. Japan J. Genetics. 40(1), 15-19.
- EGUCHI M., SUGIMOTO T. (1965) Changes in esterase zymograms in the silkworm, *Bombyx mori* L., during development. J. Ins. Physiol. 11, 1145-1149.
- EGUCHI M., YOSHITAKE N. (1966) Genetics studies on isozymes of the integument esterase in the silkworm, *Bombyx mori* L. Japan J. Genetics. 41(4), 267-273.
- EGUCHI M., YOSHITAKE N. (1967) Relationship of non-specific esterase zymograms in different tissues in the silkworm *B. mori* L. J. Sericult. Sci. Japan 36(3), 193-198.
- EGUCHI M., IWAMOTO A. (1975) Changes in protease, esterase and phosphatases in the alimentary canal of the silkworm during metamorphosis. Insect. Biochem. 5, 495-507.
- HE J. L. (1995) Studies on the inheritance of a deletion type of the blood esterase isoenzymes in the silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia. 35(1), 17-24.
- KAI H., HASEGAWA K. (1972) Electrophoretic protein patterns and esterase zymograms in ovaries and mature eggs of *B. mori* in relation to diapause. J. Insect. Physiol. 18, 133-142.
- KONICHEVA A., EGOROVA T., PHILLIPPOVICH Y. (1977) Esterase activity in haemolymph of various silkworm races. Ann. Moscou St. Ped. Inst. 19, 36-39 (in Russian).
- KONICHEVA A., EGOROVA T., PHILLIPPOVICH Y. (1979) Complex evaluation of silkworm races studying some soluble proteins and enzymes. Biochemistry of Insects. M. XXI, 68-73 (in Russian).
- KRISHNAMURTHY N., RAMESH S., RAJASEKARASETTY M. (1984) Developmental profiles in the isozymes of 1- and 2-esterases in the embryogenesis of silkworm *Bombyx mori*. Curr. Sci. (India). 53(5), 281-284.
- KUTUZOVA N., SHAMSHINA T., GOLUBEVA E., TISHTENKO G., HEIFETZ A. (1985) Hormonal regulation of the activity of acid phosphatase and esterases in silkworm. Biochemistry of Insects. M. 71-79 (in Russian).
- MININA N., PHILLIPPOVICH Y. (1974a) Various enzyme forms and regulation of their activity in silkworm (*B. mori* L.) tissue during ontogenesis. Ann. Moscow St. Ped. Inst. 16, 9-90 (in Russian).
- MININA N., PHILLIPOVICH Y. (1974b) Enzymes forms in silkworm source races and their hybrids. Ann. Moscow St. Ped. Inst. 17, 5-31 (in Russian).
- SHABALINA A. (1990) Esterase genetic polymorphism in haemolymph of larvae *Bombyx mori* L. Comptes-rendus de l'Academie bulgare des Sciences 43(9), 105-108.
- XU J., SONG H., (1987) A study on esterase izozyme of silkworm (*Bombyx mori*) embryo. Sericologia. 27(2), 309-314.
- YOSHITAKE N., EGUCHI M., TSUTIJA J. (1966) Distribution of different types of silk-gland esterases in different silkworm races. J. Sericult. Japan. 35(5), 331-335.
- YOSHITAKE N. (1970) Origin and differentiation of the silkworm races. Japan Agriculture Research Quarterly, 5(4), 38-43.

ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES ESTERASES DE L'HEMOLYPHE AU COURS DE L'ONTOGENESE CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

TEODORA STOYKOVA¹, PETAR POPOV & BOJAN DIMITROV²

1. Department of Genetics, University of Plovdiv, Plovdiv 4000, Bulgarie.

2. Institute of Genetics, Sofia 1113, Bulgarie.

*Nous avons étudié les estérases non spécifiques chez les larves, les nymphes et les adultes de seize races et huit hybrides F1 inter-raciaux du ver à soie *Bombyx mori* L. conservés en Bulgarie. Nous avons visualisé dix fractions d'activité estérase par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les données obtenues montrent que les enzymes sont contrôlées par cinq loci : *Bes A*, *Bes B*, *Bes C*, *Bes D* et *Bes E*. Nous avons déterminé une expression spécifique en fonction du stade. Nous avons observé un polymorphisme diallélique et triallélique pour quatre des loci. La fréquence des allèles sur les loci polymorphiques, le degré de polymorphisme et l'hétérozygotie montrent une spécificité de la race. Sur certains loci, on observe aussi une expression spécifique de la race.*

INTRODUCTION

Les spectres estérases de l'hémolymph ont été étudiés chez quelques organes du ver à soie depuis de nombreuses années (Eguchi et coll., 1965 ; Eguchi et Yoshitake, 1966 ; Eguchi et Yoshitake, 1967 ; Yoshitake et coll., 1966 ; Egorova et coll., 1977). Différentes techniques électrophorétiques ont caractérisé des races d'origines et d'endroits variés (Eguchi et Sugimoto, 1965 ; Yoshitake, 1970 ; Konicheva et coll., 1979 ; Egorova et coll., 1985 ; Shabalina, 1990). Cependant, les données expérimentales et l'interprétation des auteurs varient de manière considérable (Eguchi et coll., 1965 ; Eguchi et Yoshitake, 1966 ; Egorova et coll., 1985 ; Shabalina, 1990 ; He, 1995). De plus, l'interprétation génétique des spectres électrophorétiques des estérases manque dans la plupart des publications connues (Eguchi et Iwamoto, 1975 ; Kai et Hasegawa, 1972 ; Minina et Philippovich, 1974a ; Minina et Philippovich 1974b ; Egorova et coll., 1977 ; Konicheva et coll., 1977 ; Krishnamurthy et coll., 1984 ; Kutuzova et coll., 1985 ; Xu et Song, 1987). L'expression et le polymorphisme sur les loci des estérases n'ont pas encore été étudié chez les races conservées en Bulgarie. Notre recherche se propose donc d'étudier la spécificité des spectres des estérases, leur polymorphisme et leur expression pendant l'ontogénèse chez les souches bulgares.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons étudié en tout 1200 spécimens à partir de seize races conservées en Bulgarie et désignées P14, P15, 19, 20, B517, T106, T108, M1, M2, UK17, UK18, UK19, UK20, Tashkent 12, Tashkent 15 et Tashkent 16 et d'hybrides inter-raciaux F1 P14 × P15, P15 × P14, M1 × M2, M2 × M1, UK17 × UK19, UK19 × UK17, UK18 × UK20 et UK20 × UK18. Les races P14, P15, 19 et 20 sont originaires de Bulgarie et le reste a été introduit. La race B517 est polyvoltine et de faible productivité tandis que toutes les autres sont monovoltines et très productives. Les spécimens sont sélectionnés chez différentes familles de chaque race et des hybrides réciproques. On analyse les spectres estérases de l'hémolymph à différents stades de développement du ver à soie (larves — 1er

au 5^{ème} âge, larves qui filent, nymphes 1^{er}–2^{ème} jour, 5^{ème}–6^{ème} jour, 8^{ème}–10^{ème} jour et imago). Les échantillons sont pris sur des spécimens séparés ou sur un ensemble de 20 spécimens en raison de la quantité limitée d'hémolymph chez les larves du 1^{er} et du 2^{ème} âge. Pour tous les autres, les échantillons sont prélevés sur un spécimen unique. On enregistre aussi le sexe au stade du 4^{ème} âge – imago.

On obtient l'hémolymph en piquant une des pattes abdominales de la larve ou le thorax de la nymphe ou de l'imago avec une aiguille. On y ajoute un tampon tris-phosphate à 0,8 M à un pH de 6,7 et on applique 10 µl de chaque échantillon sur le gel. On réalise l'électrophorèse sur des gels verticaux de polyacrylamide à 6 % et 7,5 %, au pH de 8,9 à 4° C et 4,5 mA / cm pendant 3 h. On utilise des gels concentrés en polyacrylamide à 3,3 % avec un pH de 6,7 et un tampon électrode de tris-glycine 0,2 M à 0,05 M au pH de 8,3. On visualise les estérases non spécifiques dans un tampon phosphate 1M au pH de 7,0. On utilise un mélange d' α - et de β -naphthylacétate comme substrat et un sel BB Fast Blue comme colorant. Les plaques colorées sont fixées dans de l'acide trichloroacétique à 14 % pendant 2 heures et sont stockées dans de l'acide acétique à 7 %.

On calcule le degré de polymorphisme (P) et l'hétérozygotie (H) d'après Ayala et Kiger (1987).

RESULTATS

Les spectres électrophorétiques des estérases détectés chez les races de vers à soie et les hybrides F1 suggèrent qu'il n'y a pas de différence considérable du nombre de fractions et d'intensité de coloration en fonction de la concentration du gel. On détecte 10 fractions d'activité estérase dans l'hémolymph de toutes les races et hybrides à divers stades de développement. Elles sont situées dans 5 zones (Figs. 1, 2). On observe des différences de nombre et d'intensité des bandes estérases pendant la période allant du 1^{er} âge à l'imago. Dans certains échantillons d'hémolymph pris sur des larves des 1^{er} et 2^{ème} âges, on ne détecte qu'une bande d'activité estérase – BES A. Dans des échantillons mélangés, c'est à dire obtenus à partir de plusieurs spécimens pendant la même période d'ontogénèse, on observe en plus de cette fraction de faibles bandes estérases dans les zones : B et C – chez la race B517 ; et dans B, C et D chez toutes les autres races. On pense que l'absence de ces bandes dans les spectres individuels des larves des 1^{er} et 2^{ème} âges est provoquée par une faible concentration en estérases. Les bandes estérases chez les larves des 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} âges sont peu colorées à l'exception de BES A.

BES A est la bande la plus intensément colorée chez toutes les races et les hybrides de vers à soie à tous les stades étudiés. Chez certains échantillons d'hémolymph de larves de toutes les races (à l'exception de T108) et d'hybrides à tous les stades ontogénétiques, (à l'exception des nymphes du 8^{ème} et 10^{ème} jour et des imagos), les bandes BES B1 et BES B2 sont présentes soit séparément soit ensemble (Fig. 1, 2, 3 et 4). On ne détecte que BES B2 dans T108.

On observe des bandes estérase très fortes – BES C2 dans la zone C à tous les stades ontogénétiques chez la race B517 (Fig. 1, 3). Chez les autres races et leurs hybrides, ces bandes sont très faibles et ne sont visibles ni à la fin du dernier stade larvaire ni au début du stade nymphal (Fig. 2). Les bandes BES C1, BES C2 et BES C3 sont présentes en paires ou séparément dans le spectre individuel de l'hémolymph des races M2, UK17 et UK19. Dans les spécimens uniques BES C1 et BES C2 ou BES C2 et BES C3 sont visualisées soit en combinaison soit séparément dans cette zone chez les races UK20, Tashkent 12, M1, UK18 et Tashkent 5 (Fig. 2, 3). On ne détecte que les bandes BES C1 ou BES C2 chez toutes les autres races. Seule BES C2 est présente chez les hybrides.

On détecte l'activité estérase dans la zone D chez toutes les races et leurs hybrides testés à tous les stades ontogénétiques. On n'observe pas cette activité dans le spectre de la race B517 avant le 3^{ème} âge larvaire (Fig. 1). On peut voir les bandes BES D1, BES D2 et BES D3 soit en paires ou séparément dans le spectre de l'hémolymph des larves, des nymphes et des adultes des races T106, M1, UK17, UK19, Tashkent 16 et des hybrides UK17 × UK19 et UK19 × UK17 (Figs. 2, 3, 4). On observe aussi les bandes BES D1 et BES D2 en paires ou séparément dans les échantillons des races

19, 20, M2, Tashkent 12 et Tashkent 15 ainsi que chez les hybrides F1 P14×P15, P15×P14, M1×M2, M2×M1, UK18×UK20 et UK20×UK18 (Fig. 2). On visualise BES D1 et BES D3 chez B517 et T108 (Figs 1, 2, 4). Seule la fraction BES D1 est présente dans le spectre des races P15, UK20 et BES D2 est présente dans celui de P14, UK18 (Fig. 2, 4).

On ne détecte qu'une seule bande dans la zone E – BES E1 chez certains spécimens des races 19, M1, M2 et Tashkent 15 ainsi que chez les hybrides F1 de M1×M2 et de M2×M1 dans l'hémolymphe du 3^{ème} âge larvaire à l'imago (Fig. 2).

On ne détecte pas de différences liées au sexe dans le spectre estérase des spécimens testés.

On observe des bandes "jaunes" sur BES E1 dans certaines plaques PAGE pour l'hémolymphe du 4^{ème} âge larvaire à l'imago. Elles ne se distinguent pas très clairement des bandes estérases par la photographie (noir et blanc). Cependant, ces fractions ne sont pas colorées en rouge-marron, la couleur typique des estérases non-spécifiques. C'est la raison pour laquelle nous n'en discutons pas. On visualise les protéines de stockage (SP1 et SP2) dans la même zone (données non publiées).

DISCUSSION

Certains auteurs ont rapporté un contrôle polygénique des estérases de l'hémolymphe chez *Bombyx mori* L. (Egorova et coll., 1985 ; Shabalina, 1990 ; He, 1995). He (1995) a décrit un polymorphisme de type "déletion" avec une estérase - Bes Ao chez certaines races et hybrides élevés en Chine. La cholinestérase A détectée correspond à BES A, que l'on a identifiée dans notre étude comme la bande intense dans les échantillons pris sur tous les spécimens à tous les stades de l'ontogenèse. Cette observation implique que le locus de Bes A chez les races et les hybrides testés est monomorphique. Nos données ne concordent pas avec celles d'Egorova et coll., (1985) et de Shabalina (1990) qui ont rapporté un système de bi-allélique codominant sur le locus Es 1, qui correspond au locus de Bes 1. La différence est probablement due à l'origine différente des races étudiées.

Egorova et coll., (1985), Shabalina (1990) et He (1995) ont rapporté un polymorphisme codominant bi-allélique de l'estérase située dans la zone B chez les races qu'ils ont étudiées. La localisation des bandes BES B1 et BES B2 que nous avons observée dans le spectre estérase des races P14, P15, 19, 20, B517, T106, M1, M2, UK17, UK18, UK19, UK20, Tashkent 12, Tashkent 15 et Tashkent 16 ainsi que chez leurs hybrides confirme ces observations. Tous les spécimens de la race T108 ne sont homozygotes que pour l'allèle Bes B2. On trouve les deux allèles Bes B1 et Bes B2 chez les génotypes homozygotes et hétérozygotes pour les autres races (Tableau I).

Il n'y a pas d'information dans les références disponibles pour *B. mori* L sur la présence d'activité estérase dans la zone C. On visualise trois fractions dans cette zone. Leur présence combinée dans certains spectres électrophorétiques confirme l'hypothèse d'un polymorphisme codominant tri-allélique. Les trois allèles de ce locus sont présents dans le pool génétique des races M2, UK17 et UK19 (Tableau I). On trouve des génotypes homozygotes ou hétérozygotes pour les allèles Bes C1 et Bes C2 chez les races UK20 et Tashkent 12. Les homozygotes Bes C2/Bes C2 dominent quantitativement. Cela indique que la fréquence de l'allèle Bes C2 dans le pool génétique des races est beaucoup plus élevée que celle de l'allèle Bes C1 tandis que l'allèle Bes C3 est absent (Tableau I). Les génotypes qui sont homozygotes et hétérozygotes pour les allèles Bes C2 et Bes C3 sont présents chez les races M1, UK18 et Tashkent 15. Il y a rarement des homozygotes de type Bes C3/Bes C3, ce qui est probablement dû à une faible fréquence de l'allèle Bes C3 dans le pool génétique de ces races. Nos résultats montrent que les races 20, T106 et T108 sont homozygotes. Elles sont du type Bes C1/Bes C1. Les races P14, P15, 19, B517 et Tashkent 16 ainsi que les hybrides F1 sont des homozygotes Bes C2/Bes C2. Ces données suggèrent que le site Bes C est monomorphique chez les races P14, P15, 19, 20, B517, T106, T108 et Tashkent 16 ainsi que chez les hybrides F1 (Tableau I). L'allèle Bes C2 est présent dans le pool génétique des autres races à une fréquence plus élevée. Les raisons expliquant l'absence de données observée par certains auteurs concernant l'activité estérase

dans la zone C ne sont pas très claires (Egorova et coll., 1985 ; Shabalina 1990 He 1995). Une des explications probables pourrait être l'incidence limitée des produits du locus Bes C que l'on n'observe qu'à certains stades ontogénétiques.

Egorova et coll., (1985) ont observé le monomorphisme de certaines fractions situées dans une zone correspondant à celle que nous désignons comme " D ". Shabalina (1990) a décrit les produits du polymorphisme codominant biallélique dans la même zone et proposé l'existence d'un troisième allèle (" nul "). He (1995) a rapporté un polymorphisme triallélique sur un site analogue. Dans notre étude, nous détectons trois fractions dans la zone D. Leur combinaison dans des spectres séparés révèle un polymorphisme codominant triallélique. Cela est en accord avec les observations de He (1995). Les trois allèles de ce locus sont présents dans le pool génétique des races T106, M1, UK17, UK19, Tashkent16 et des hybrides UK17 × UK19 et UK19 × UK17 (Tableau I). On trouve les allèles Bes D1 et Bes D2 combinés dans les génotypes homozygotes et hétérozygotes du pool génétique des races 19, 20, M2, Tashkent12 et Tashkent 15 ainsi que dans ceux des hybrides F1 P14 × P15, P15 × P14, M1 × M2, M2 × M1, UK18 × UK20 et UK20 × UK18. Les allèles Bes D1 et Bes D3 sont présents dans le pool génétique des races B517 et T108 (Tableau I). Les races P15 et UK20 sont homozygotes pour l'allèle Bes D1 tandis que P14 et UK18 sont homozygotes pour l'allèle Bes D2.

Eguchi et coll., (1965) ont observé " une estérase de type zero - 00 " provenant d'un allèle " zéro " qui est typique chez 20 % des races chinoises, japonaises et européennes étudiées. Egorova et coll., (1985), Shabalina (1990) et He (1995) n'ont pas détecté d'activité estérase dans la zone E dans le spectre électrophorétique des races testées. Nos données indiquent qu'il n'y a qu'une fraction située dans cette zone pour les races 19, M1, M2 et Tashkent15 ainsi que chez les hybrides M1 × M2 et M2 × M1. Son intensité variable et son absence du spectre des spécimens individuels pourrait indiquer l'incidence d'un polymorphisme diallélique avec un allèle " nul " (Bes Eo). L'absence de cette fraction dans le spectre électrophorétique du reste des races et des hybrides pourrait être due à une homozygotie pour l'allèle " nul ".

Les résultats de notre étude suggèrent que la synthèse des 10 fractions estérase qui se trouvent dans l'hémolymphe du ver à soie est contrôlée par 5 loci estérase (Bes A, Bes B, Bes C, Bes D et Bes E). L'analyse électrophorétique révèle des différences de fréquence des allèles sur les loci polymorphiques chez les races et hybrides variés étudiés (Tableau I).

Les résultats de notre étude sur l'expression spécifique des loci des estérases en fonction du stade sont particulièrement intéressants. Dans les références disponibles, nous n'avons trouvé aucune donnée concernant la variation de l'expression des loci estérases pendant le développement ontogénétique du ver à soie. La baisse de Bes B1 et Bes B2 observée dans l'hémolymphe de la nymphe et leur absence à la fin du stade de la nymphe et de l'imago chez les races et les hybrides étudiés permet de conclure qu'il se produit une répression de l'activité du gène sur le site Bes B à la nymphose. On n'observe une forte expression et on détecte les produits du gène Bes C à tous les stades ontogénétiques que chez la race B517. Chez les autres races et hybrides, ces produits sont absents ou ont une activité faible. Konicheva et coll., (1977) ont conclu que les différences d'activité estérase chez les races proviennent de la spécificité de leur métabolisme. Les résultats de notre étude suggèrent qu'elles sont plutôt génétiquement déterminées. Le locus Bes D est exprimé à tous les stades ontogénétiques chez tous les hybrides et races mais chez B517, on n'observe pas les produits du locus avant le troisième âge.

Sur la base des résultats présentés ici, nous avons déterminé le niveau de polymorphisme et d'hétérozygotie chez toutes les races et hybrides testés (Tableau II). Nous trouvons le niveau le plus élevé de polymorphisme chez les races M1, M2 et Tashkent 15. Les races et les hybrides étudiés sont hétérogènes génétiquement et on observe une différence par rapport à la fréquence des allèles sur les loci polymorphiques de l'estérase. Chez la plupart des races observées, l'hétérozygotie est plus faible que celle prévue (Tableau II), ce qui est dû à des croisements appropriés qui conduisent à une élimination progressive de la variation. On trouve l'hétérozygotie la plus élevée chez les formes hybrides.

AERODYNAMIC PARAMETERS AND DESIGN OF FLIGHT SURFACE OF THE SILKWORM PEST *EXORISTA SORBILLANS* WIEDEMANN (DIPTERA:TACHINIDAE)

S. SUGNANA KUMARI¹, U. SURYANARAYANA MURTY^{1*}, ADEEL AHMED³ & A. RADHAKRISHNA²

1. Bioinformatics Group, Biology Division, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad – 500 007, AP, India.
2. Computer Center, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad – 500 007, A.P, India.
3. Department of Biophysics, Nizam College, Hyderabad, A.P. India.

The Aerodynamic parameters of the fly, Exorista sorbillans, (Diptera:Tachinidae) a serious pest on silkworm was investigated. The data represents the 'system' in bio aerodynamics which comprises the uzifly and induced air and constitute 'action – reaction pair' for the hovering flight. Hence, the static and dynamic parameters of the species are determined. An expression for moment of inertia of the flight surface is deduced considering wing design and geometry. Further, aerodynamic requirements in relation to flight performance of the uzi fly are elaborated. It is concluded that this study provides useful information on the hovering flight behavior of uzifly.

Keywords: System, action-reaction pair, moment of inertia, flight surface, wing beat.

INTRODUCTION

Among the insect pests that attack silkworm the most formidable ones is a dipteran parasitoid, *Exorista sorbillans* Wiedemann other wise called uzifly. The extent of damage ranges from 10-30%. This parasitoid is a member of the Tribe Exoristini under the sub-family Goniinae belonging to the family Tachinidae of the order Diptera. Presence has been reported in Bangladesh, China, Japan, India, South Korea, Thailand and Vietnam. (Sengupta *et al* 1990)

The silkworm larvae infested up to early fifth instar die before they reach the spinning stage. If infestation takes place in the late fifth instar, the mature maggot comes out by piercing the cocoon and there by rendering the cocoons unfit for mass reeling. Infested silkworms or pupae can be identified by the presence of black scar on the part of the skin where the maggot penetrates into the body of the host larvae, completes its three stages inside the silkworm body and comes out and pupates in the soil. After 12-14 days the adult fly will emerge and reinfest the silkworm. (Ullal *et al*, 1994)

The biophysical characters of uzifly, a major pest on silkworm was investigated. The wing beat frequency of an insect is an important parameter in aerodynamics and bioenergetics from the point of view of ecological relationships. The frequency at which the wings are moved has been a speculation and the attempted observations are controversial for more than three quarters of a century (Chadwick, 1985). Flight performance and physical principles involved in a insect flight were studied

* Author to whom the correspondence should be addressed Telephone: 00-91-40-7193134.Fax: 00-91-40-7160757, email: usnmurty@iict.ap.nic.in, murty usn@yahoo.com, IICT Communication Number: 020407

in locust by Weis Fogh and Jensen (1965). The flight behaviour of *Drosophila* was studied by Vogel (1966). Aerodynamic parameters of *Chrysocoris purpureus* were studied by Arvinda Babu *et al.* (1978). Adeel Ahmed and Gopalakrishna (1979) reviewed the work, both theoretical and experimental on the wing beat frequency of various myogenic and neurogenic insects. Adeel Ahmed (1978) studied bio acoustics and aerodynamics of natural fliers along with their body parameters which are species specific. Comparative studies on flight characteristics, moment of inertia and flight behavior of two fly catchers *Dicrurus adsimilis* and *Merops orientalis* were carried out by Chari *et al.*, (1982). Wing vibrations of *Anopheles stephensi* was analysed and aerodynamic parameters and design of flight surface of this mosquito were studied by Hasan *et al.*, (1983 and 1984). A comparative study of flight surface and aerodynamic parameters of insects, birds and bats was carried out by Adeel Ahmed (1984).

When the insect is in hovering state it is said to be in the dynamic equilibrium. This is achieved by the insect by generating the air induced downwards due to its wing beat, which in turn develops a force to balance its body weight. The insect and induced air, put together are considered as a system. Thus in hovering flight the system constitutes an "action-reaction pair" which helps the insect to be air-borne.

In view of this, we have studied the static and dynamic parameters of the system (flier and air), and aerodynamic parameters of *Exorista sorbillans*. Considering the wing design and geometry we have deduced the moment of inertia of the flight surface of this fly.

MATERIALS AND METHODS

For this study, Uzi maggots were collected from the cocoon market, Hindupur, Anantapur District, A.P. and kept in laboratory conditions till the time of emergence. 2 days-old 10 flies of each sex were selected.

Calculation of wing beat frequency and related parameters:

The wing mass and body mass of the uzifly were measured using a sensitive analytical balance of least count of 0.001mg. The dimensions of the fly and its wings were measured under suitable magnifications by using a photographic enlarger (Durst AC650, made in Italy).

The wing stroke was observed under the synchronized stroboscopic flash. The stroke angle was determined by keeping a circular scale behind the fly and viewing through the Cathetometer. The stroke angle was about 60°. The area of the wings was determined by considering the expression, $A = \frac{\pi l c}{4}$ (chord length), since the wings are approximately elliptical in shape. The same was verified by using a planimeter. Expressions for different parameters were derived listed under "Appendix 1".

Calculation of moment of Inertia:

Observations on the wing movements under the stroboscopic flash showed that wing vibrated about the axis YY which were parallel to the body axis of the flier. The wing tip made elongated 8 in the vertical plane with reference to the body plane and there was buckling at the tip about the axis OX to a certain extent. To computer the moment of inertia of a body, the axis of rotation and uniform distribution of mass along that axis are requisite parameters.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the average values of static parameters of ten of each of male and female flies. Mass, length, breadth, fineness ratio of the insect, the span, length, area, effective breadth, stroke angle, swept area, swept volume, disc area and arc length of the wing are considered as static parameters. A significant variation is observed in body mass of male and female *Exorista sorbillans*.

Slight variation is observed in wing length, wing span, length of the flier, breadth of the flier, wing mass, wing swept area, wing swept volume of *Exorista* of either sex. The static parameters are essential as from these the dynamic parameters of the system and aerodynamic parameters of the flier are derived. Dynamic parameters like moment of inertia, angular velocity, angular acceleration and angular momentum of flight surface are presented in Table II. Significant differences in these parameters are observed among the sex.

The moment of inertia, the measure of the resistance a body offers to a change in the rotational motion about a given axis forms the basis for the calculation of kinetic energy of the rotating body (wing). The values of moment of inertia of the flight surface are in the range of 0.0149×10^{-3} in males and 0.0201×10^{-3} in females.

Table I. Static Parameters of *Exorista sorbillans*.

Tableau I. Paramètres statiques d'*Exorista sorbillans*.

Sl. No.	Static Parameters	Male	Female
No de série	Paramètres statiques	Mâle	Femelle
1	Body mass / Masse corporelle ($\times 10^{-3}$ gm)	26.68 $\pm$ 6.135	32.42 $\pm$ 3.034
2	Wing length / Longueur de l'aile (cm)	0.625 $\pm$ 0.0273	0.677 $\pm$ 0.0439
3	Wing span / Envergure de l'aile (cm)	1.500 $\pm$ 0.0689	1.620 $\pm$ 0.0998
4	Wing area / Surface de l'aile (cm ²)	0.116 $\pm$ 0.0149	0.144 $\pm$ 0.0161
5	Effective wing breadth (cm) Largeur efficace de l'aile (cm)	0.186 $\pm$ 0.0169	0.212 $\pm$ 0.0121
6	Length of the flier / Longueur de l'insecte (cm)	0.917 $\pm$ 0.0447	1.035 $\pm$ 0.0502
7	Breadth of the flier / Largeur de l'insecte (cm)	0.250 $\pm$ 0.0158	0.256 $\pm$ 0.0122
8	Wing mass / Masse de l'aile ($\times 10^{-3}$ gm)	0.121 $\pm$ 0.0084	0.138 $\pm$ 0.0102
9	Disc area / Surface du disque (cm ²)	1.771 $\pm$ 0.159	2.069 $\pm$ 0.335
10	Wing swept area (cm ²) Surface balayée par l'aile (cm ²)	2.362 $\pm$ 0.212	2.759 $\pm$ 0.237
11	Wing swept volume ($\times 10^{-3}$ cm ³) Volume balayé par l'aile	443.1 $\pm$ 74.54	589.5 $\pm$ 97.08
12	Fineness ratio / Ratio de finesse	3.675 $\pm$ 0.139	3.906 $\pm$ 0.0928
13	Arc length / Longueur de l'arc (cm)	0.654 $\pm$ 0.0286	0.709 $\pm$ 0.0460
14	Total wing area / Surface totale de l'aile (cm ²)	0.288 $\pm$ 0.0322	0.288 $\pm$ 0.0322

Table II. Dynamic Parameters of Flight Surface of *Exorista sorbillans*.**Tableau II. Paramètres dynamiques de la surface de vol d'*Exorista sorbillans*.**

Sl. No.	Dynamic parameters of flight surface	Male	Female
No. de Série	Paramètres dynamiques de la surface de vol	Mâle	Femelle
1	Moment of inertia / <i>Moment d'inertie</i> ($\times 10^{-3}$ g cm ²)	0.0149 $\pm$ 0.0021	0.0201 $\pm$ 0.0039
2	Angular velocity / <i>Vélocité angulaire</i> (rad / sec)	358.5 $\pm$ 37.97	333.47 $\pm$ 27.58
3	Angular acceleration / <i>Accélération angulaire</i> ($\times 10^3$ rad/sec ²)	248.16 $\pm$ 50.38	213.75 $\pm$ 35.90
4	Angular momentum / <i>Moment angulaire</i> ($\times 10^3$ rad g cm ² /sec)	5.386 $\pm$ 1.116	6.622 $\pm$ 0.826
5	Kinetic energy / <i>Energie cinétique</i> (erg)	0.982 $\pm$ 0.294	1.095 $\pm$ 0.080

Table III. Dynamic Parameters of Air Induced of *Exorista sorbillans*.**Tableau III. Paramètres dynamiques de l'air induit par *Exorista sorbillans*.**

Sl. No.	Dynamic parameters of air induced	Male	Female
No. de série	Paramètres dynamiques de l'air induit	Mâle	Femelle
1	Rate of mass flow <i>Taux du flux de masse</i> (g/sec)	0.0212 $\pm$ 0.0062	0.0302 $\pm$ 0.0064
2	Mass / <i>Masse</i> ($\times 10^{-5}$ g)	48.74 $\pm$ 8.199	64.84 $\pm$ 1.067
3	Acceleration (cm/sec ²)	7713.74 $\pm$ 1342.29	7352.83 $\pm$ 776.0
4	Velocity / <i>Vélocité</i> (cm/sec)	70.34 $\pm$ 5.657	72.47 $\pm$ 1.998
5	Kinetic energy / <i>Energie cinétique</i> ($\times 10^{-1}$ erg)	12.293 $\pm$ 0.373	16.96 $\pm$ 0.2426
6	Momentum / <i>Moment</i> ($\times 10^{-3}$ g cm / sec)	34.649 $\pm$ 0.136	46.80 $\pm$ 0.0715

Table IV. Aerodynamic parameters of *Exorista sorbillans*.**Tableau IV. Paramètres aérodynamiques d'*Exorista sorbillans*.**

Sl. no.	Aerodynamic parameters	Male	Female
No. de Série	Paramètres aérodynamiques	Mâle	Femelle
1	Aspect ratio / Ratio d'aspect	1.687 ± 0.105	1.594 ± 0.07692
2	Wing loading / Charge alaire (g/cm ²)	0.00639 ± 0.0021	0.00945 ± 0.0018
3	Disc loading / Charge du disque (g/cm ²)	0.0149 ± 0.0023	0.1573 ± 0.00087
4	M _w / M _f	0.00472 ± 0.00083	0.00429 ± 0.00019
5	Frequency of wing beat / Fréquence de battement de l'aile (Hz)	108.89 ± 11.53	101.28 ± 8.377

Table III gives the data on the dynamic parameters of air induced downward due to the wing beat of the insect, such as mass, rate of mass flow, acceleration, velocity and linear momentum of the induced air during the hovering flight. Differences to some extent in these parameters, are evident with respect to sex of the uzifly.

Aerodynamic parameters like aspect ratio, wing loading, disc loading, M_w/M_f and frequency of wing beat of uzifly are tabulated in Table IV. Considerable variations are observed in the frequency and its derived aerodynamic parameters of male and female uzifly.

The wing loading indicated a relatively lower wing area in relation to the mass of the flier. The wing loading values in insects were generally lower in comparison to birds (Hasan *et al.*, 1984).

Table IV shows that *Exorista sorbillans* has a moderate aerodynamic efficiency due to its aspect ratio (1.687 in males and 1.594 in females) compared to other insects. These findings contribute to a greater understanding of the swarming behavior of this species, and can be concluded that *Exorista sorbillans* is a moderate fly. It is therefore, evident, that the wing mass / body mass is an important biophysical parameter with respect to the determination of the metabolic rate of the flight machinery.

APPENDIX 1 / ANNEXE 1

M_f = Mass of the flier / Masse de l'insecte (g)

l = Length of the wing (cm) / Longueur de l'aile (cm)

L = Span of the Wing / Envergure de l'aile = 2l + b_f (cm)

A_w = Area of the Wing (Single) (cm²) / Surface de l'aile (individuelle) (cm²)

A = Total wing area / Surface totale de l'aile = 2 A_w (cm²)

B_{eff} = Effective breadth of the wing / Largeur effective de l'aile = A_w / l (cm)

l_f = Length of the flier / Longueur de l'insecte (cm)

b_f = Breadth of the flier / Largeur de l'insecte (cm)

C = Chord length (cm) / Longueur de la corde

M_w = Mass of the wing / *Masse de l'aile* (g)

φ = Stroke angle / *Angle de frappe* (rad)

S_d = Area of the wing disc / *Surface du disque de l'aile* = $(\pi L^2/4)$, (cm²)

S_w = Wing swept area / *Surface balayée par l'aile* = $(1/3) ((\pi L^2 B_{eff}))$ (cm²)

V_w = Wing swept volume / *Volume balayé par l'aile* = $((\pi L^2 S_w B_{eff}/3))$ (cm³)

I = Moment of inertia of the wing / *Moment d'inertie de l'aile* = $(5/16) (M_w l^2)$ (g.cm²)

v = Frequency of wing beat / *Fréquence de battement de l'aile* = $2x M_f / S_w B_{eff} \rho$ (Hz)

ω = Angular velocity of the wing / *Vélocité angulaire de l'aile* = $(1/3) (\pi^2 v)$, (rad sec⁻¹)

α = Angular acceleration of the wing / *Accélération angulaire de l'aile* = $(2/3) (\pi^3 v^2)$ (rad. Sec⁻¹)

θm = Angular momentum of the wing / *Vitesse angulaire de l'aile* = $I\omega$, (g cm² rad. Sec⁻¹)

z = Arch length / *Longueur de l'arc* = $(1/3) ((\pi l))$ (cm)

γ = Fineness rating / *Score de finesse* = l_f/b_f

λ = z/c

AR = Aspect ratio / *Ratio d'aspect* = l^2/A

ρ = Density of air / *Densité de l'air* = 1.1×10^{-3} (g cm⁻³)

dm/dt = Rate of mass flow of air / *Taux de flux de la masse de l'air* = $S_w B_{eff} \rho v l^2$ (g sec⁻¹)

m_a = Mass of the induced air / *Masse de l'air induit* = $S_w B_{eff} \rho$ (g)

v_{iz} = Velocity of induced air / *Vélocité de l'air induit* = $(M_f g)^{1/2} / (2 S_w \rho)^{1/2}$ (cm)

a_{iz} = Acceleration of the induced air / *Accélération de l'air induit* = $v_{iz} v$, (cm sec⁻²)

K_a = Kinetic energy of induced air / *Energie cinétique de l'air induit* = $(1/2) (m_a v_{iz}^2)$ (erg)

P_a = Momentum of induced air / *Vitesse de l'air induit* = $m_a v_{iz}$ (g cm sec⁻¹)

WL = Wing loading / *Charge alaire* = M_f/A (g cm⁻²)

DL = Disc loading / *Charge du disque* = $M_f l$ (g cm²)

KE = Kinetic energy / *Energie cinétique* = $1/2 I\omega^2$

Thus, the present results envisaged the characteristic differences in the design and function of the flight surface, and the aerodynamic parameters of the uzifly may explain the flight adaptation of the dipteran flight. Kinetic energy of wings required for the wing oscillations is a function of frequency of wing beat and also involves the dynamic parameters such as moment of inertia, angular velocity and angular momentum. Kinetic energy is low in males and high in females, showing that the energy consumption to keep the wings in motion is high in females when compared to males. Since the wing beat frequency is high in males the consumption of kinetic energy is low. In such cases males fly longer distance than females from the emergence point. This is an important observation in fecundity point of view as number of virgin females can be successfully mated in different rearing places ultimately maximum number of silkworm crops will be damaged by the pest. In general wing beat frequency is dependant upon ratio between the power of the wing muscle and the "resistance" (weight) of the load. Large winged, light bodied butterflies may have a wing beat frequency of 4-20 beats per second (bps), whereas a small winged, heavy bodied flies and bees beat their wings more than 100 times a second and even mosquitoes can beat up to 988-1046 times a second (Suryanarayana Murty *et al.* 1993). In the present study it was recorded the wing beat frequency of male and female uzifly is 108.89 and 101.28 respectively. This information is very important to understand the flight adaptation of the uzifly.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Director, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad for his continuous support and facilities provided to carry out the study.

REFERENCES

- ADEEL AHMED (1978) Studies on bioacoustics and aerodynamics of flier, Thesis Osmania University.
- ADEEL AHMED, GOPALAKRISHNA G. (1979) Wing beat frequency of a flier. A brief review. In vistar in molecular solid state and Biophysics. (Edited by Murty A.S.N. and Kumar.V)
- ADEEL AHMED (1984) A comparative study of flight surface and aerodynamic parameters of insects, birds and bats. Ind. J. Exp. Biology. 22, 270.
- ARVINDABABU A.,CHALAPATHI V.V.,CHARI N. (1978) Aerodynamic parameters of *Chrysocoris purpureus*. Entomon, 3,1
- CHARI N., JANAKIRAMA RAO N., RAMESH R., SATTIAH G. (1982). Comparative studies on flight characteristics, Moment of inertia and flight behavior of two fly-chatchers, *Dicrurus similis* and *Merops orientalis*. Ind. J. Exp. Biology 20(12), 894.
- CHADWICK L.E (1985). The motion of the wings. Insect Physiology. (Edited by Roeder.K.D)
- HASAN S.N., ADEEL AHMED, CHARI N. (1983) Analysis of wing vibrations of mosquito *Anopheles stephensi*. Entomon, 8, 247.
- HASAN S.N., ADEEL AHMED CHARI N. (1984) Aerodynamic parameters and design of flight surface of mosquito *Anopheles stephensi*. Entomon, 9, 247-251
- SENGUPTA K., PRADEEP KUMAR, MURTHUZABAIG , GOVINDAIAH (1990) Hand book on pest and diseases control of Mulberry and silk worm. Published by Central silk Board, Bangalore.
- SURYANARAYANA MURTY U., KAISER JAMIL, ADEEL AHMED (1993) Aerodynamic parameters and design of flight surface of mosquito *Culex quinquefasciatus*. Insect Sci. Applic. Vol 14, No.2, 205-209
- ULLAL S.R., NARASIMHANNA (1994) Hand book of practical sericulture. Published by ARUN RAMANATHAN, Central Silk Board, Bangalore, India.
- VOGEL S. (1966) Flight in *Drosophila*. 1. Flight performance of tethered flie.J. Ex .Bio 44, 567.
- WEIS FOGH T., JENSEN M. (1965) Biology and physics of Locust flight. Basic principles in insect flight. A critical review. Phyl .Trans. Res. Soc. 289 (B), 415.

PARAMETRES AERODYNAMIQUES ET CONCEPTION DE LA SURFACE DE VOL DU PARASITE DU VER A SOIE *EXORISTA SORBILLANS* WIEDEMANN (DIPTERA : TACHINIDAE)

S. SUGNANA KUMARI¹, U. SURYANARAYANA MURTY^{1*}, ADEEL AHMED³ &
A. RADHAKRISHNA²

1. Bioinformatics Group, Biology Division, Indian Institute of Chemical Technology,
Hyderabad – 500 007, AP, Inde.

2. Computer Center, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad – 500 007, A.P. Inde.

3. Department of Biophysics, Nizam College, Hyderabad, A.P., Inde.

*Nous avons étudié les paramètres aérodynamiques de la mouche, *Exorista sorbillans*, (Diptera : Tachinidae), un parasite du ver à soie. Dans la bio-aérodynamique, les données représentent le "système" qui comprend la mouche uzi et l'air induit et constitue "un couple action-réaction" pour le vol planant. Nous avons donc déterminé les paramètres statiques et dynamiques de l'espèce. Nous en avons déduit la formule de calcul du moment d'inertie de la surface de vol en tenant compte de la forme et de la géométrie de l'aile. De plus, nous avons déterminé les besoins aérodynamiques par rapport à la performance de vol de la mouche uzi. En conclusion, cette étude fournit des informations utiles sur le comportement de vol de la mouche uzi.*

INTRODUCTION

Parmi les insectes parasites qui attaquent le ver à soie, le plus redoutable est un parasitoïde diptère, *Exorista sorbillans* Wiedemann aussi appelé mouche uzi. L'étendue des dégâts est de 10 à 30 %. Ce parasitoïde est un membre du groupe des Exoristini, dans le sous-groupe des Goniinae qui appartient à la famille des Tachinidae de l'ordre des Diptères. Il est présent au Bangladesh, en Chine, au Japon, en Inde, en Corée du Sud, en Thaïlande et au Vietnam (Sengupta et coll., 1990).

Lorsque l'infestation a lieu au début du 5^{ème} âge, les larves du ver à soie meurent avant d'avoir atteint le stade de filage. Si l'infestation a lieu à la fin du 5^{ème} âge, l'asticot mature sort en perçant le cocon, ce qui rend les cocons impropres au dévidage. On peut identifier les vers à soie ou les nymphes infestées par la présence d'une marque noire à l'endroit où l'asticot pénètre dans le corps de la larve hôte, termine ses trois stades à l'intérieur du corps du ver à et sort et se nymphose dans le sol. Après 12 à 14 jours, la mouche adulte émerge et infeste à nouveau le ver à soie (Ullal et coll., 1994).

Nous avons étudié les caractères biologiques et physiques de la mouche uzi, un parasite majeur du ver à soie. La fréquence de battement de l'aile d'un insecte est un paramètre important pour l'aérodynamisme et la bioénergie du point de vue des relations écologiques. On s'est interrogé sur la fréquence à laquelle les ailes bougent et les tentatives d'observations ont soulevé beaucoup de controverses depuis plus de trois quart de siècles (Chadwick, 1985). Weis Fogh et Jensen (1965) ont étudié chez la sauterelle la performance de vol et les principes physiques impliqués dans le vol d'un insecte. Vogel (1966) a étudié le comportement de vol de *Drosophila*. Arvinda Babu et coll., (1978)

* Auteur auquel adresser la correspondance ; Téléphone : 00-91-40-7193134. Fax : 00-91-40-7160757, email : usnmurty@iict.ap.nic.in, murty usn@youoo.co., IICT Communication Number : 020407

ont étudié les paramètres aérodynamiques de *Chrysocoris purpureus*. Adeel Ahmed et Gopalakrishna (1979) ont passé en revue le travail à la fois théorique et expérimental sur la fréquence de battement de l'aile de plusieurs insectes myogènes et neurogènes. Adeel Ahmed (1978) a étudié la biologie acoustique et l'aérodynamisme d'insectes volants ainsi que leurs paramètres corporels qui sont spécifiques en fonction des espèces. Chari et coll., (1982) ont réalisé des études comparatives sur les caractéristiques de vol, le moment d'inertie et le comportement de vol de deux attrapes mouches *Dicrurus adsimilis* et *Merops orientalis*. Hasan et coll., ont analysé les vibrations de l'aile d'*Anopheles stephensi* et étudié la conception de la surface de vol du moustique (1983 et 1984). Adeel Ahmed (1984) a réalisé une étude comparative sur la surface de vol et les paramètres aérodynamiques des insectes, des oiseaux et des chauve-souris.

Quand l'insecte plane, on dit qu'il est dans un équilibre dynamique. L'insecte réussit cela en déplaçant l'air induit vers le bas grâce au battement de l'aile, qui à son tour développe une force pour équilibrer le poids de son corps. L'insecte et l'air induit, réunis ensemble, sont considérés comme un système. Ainsi dans le vol planant, le système constitue "un couple action-réaction" qui aide l'insecte à être porté par l'air.

Compte tenu de cela, nous avons étudié les paramètres statiques et dynamiques du système (insecte volant et air) et les paramètres aérodynamiques d'*Exorista sorbillans*. Nous avons déduit le moment d'inertie dans la surface de vol de la mouche en tenant compte de la forme et de la géométrie de l'aile.

MATERIELS ET METHODES

Pour cette étude, les asticots de la mouche uzi sont obtenus auprès du marché à cocons d'Hindupur, dans la région d'Anantapur et sont conservés dans des conditions de laboratoire jusqu'à l'émergence. Nous avons sélectionné 10 mouches âgées de 2 jours de chaque sexe.

Calcul de la fréquence de battement de l'aile et des paramètres associés :

Nous avons mesuré la masse de l'aile et la masse corporelle de la mouche uzi en utilisant une balance analytique sensible à plus ou moins 0,001 mg. On mesure les dimensions de la mouche et ses ailes avec les grossissements adaptés en utilisant un agrandisseur photographique (Durst AC650, fabriqué en Italie).

On observe la frappe de l'aile en utilisant un éclair stroboscopique synchronisé. On détermine l'angle de frappe en maintenant une règle graduée circulaire derrière la mouche et en l'observant par un cathétomètre. L'angle de frappe est d'environ 60°. On détermine la surface des ailes en considérant la formule, $A = \pi lc/4$ (longueur de la corde) puisque les ailes sont approximativement de forme elliptique. On vérifie cela en utilisant un planimètre. Les formules pour les différents paramètres sont présentés dans l'annexe 1.

Calcul du moment d'inertie :

Les observations sur les mouvements de l'aile sous l'éclair stroboscopique montrent que l'aile vibre selon les axes YY qui sont parallèles à l'axe du corps de l'insecte. L'extrémité de l'aile fait des huit allongés dans le plan vertical par rapport au plan du corps et l'extrémité de l'aile s'arque à un certain degré selon l'axe OX. Pour calculer le moment d'inertie d'un corps, les paramètres requis sont l'axe de rotation et la distribution uniforme de la masse le long de l'axe.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le Tableau I montre les valeurs moyennes pour les paramètres statiques chez dix mouches mâles et femelles. On considère que les paramètres statiques sont la masse, la longueur, la largeur, le ratio de finesse de l'insecte, l'envergure, la longueur, la surface, la largeur réelle, l'angle de frappe, la

surface balayée, le volume balayé, la surface du disque et la longueur de l'arc de l'aile. On observe une variation significative de la masse corporelle entre le mâle et la femelle chez *Exorista sorbillans*. On constate de légères variations de la longueur de l'aile, de l'envergure de l'aile, de la longueur de l'insecte, de la largeur de l'insecte, de la masse de l'aile, de la surface balayée par l'aile, du volume balayé par l'aile chez les deux sexes. Les paramètres statiques sont essentiels car ce sont d'eux que découlent les paramètres dynamiques du système et les paramètres aérodynamiques de l'insecte. Les paramètres dynamiques comme le moment d'inertie, la vitesse angulaire, l'accélération angulaire et la vitesse angulaire de la surface de vol sont présentés dans le Tableau II. On observe des différences significatives pour ces paramètres entre les sexes.

Le moment d'inertie, la mesure de la résistance qu'un corps offre à un changement dans le mouvement rotationnel selon un axe donné forme la base du calcul de l'énergie cinétique du corps en rotation (l'aile). Les valeurs pour le moment d'inertie de la surface de vol sont comprises entre $0,0149 \times 10^{-3}$ chez les mâles et $0,0201 \times 10^{-3}$ chez les femelles.

Le Tableau III présente les données sur les paramètres dynamiques de l'air induit par le battement de l'aile de l'insecte, telles que la masse, le taux de flux de la masse, l'accélération, la vitesse et le mouvement linéaire de l'air induit pendant le vol planant. On observe des différences évidentes pour ces paramètres en fonction du sexe de la mouche uzi.

Les paramètres aérodynamiques comme le ratio d'aspect, la charge alaire, la charge du disque, Mw/MF et la fréquence de battement de l'aile de la mouche uzi sont présentés dans le Tableau IV. On observe des variations considérables des paramètres aérodynamiques et de leur fréquence entre la mouche uzi mâle et femelle.

La charge alaire montre que la surface de l'aile est relativement faible par rapport à la masse de l'insecte. Les valeurs pour la charge alaire chez les insectes sont généralement plus faibles que celles des oiseaux (Hasan et coll., 1984).

Le Tableau IV montre qu'*Exorista sorbillans* a une efficacité aérodynamique modérée en raison de son ratio d'aspect (1,687 chez les mâles et 1,594 chez les femelles) par comparaison aux autres insectes. Ces observations contribuent à mieux comprendre le comportement d'agglutinement de cette espèce et on peut en conclure qu'*Exorista sorbillans* est un insecte volant modéré. Il est donc évident que la masse de l'aile / la masse corporelle est un paramètre biophysique important par rapport à la détermination du taux de métabolisme du mécanisme de vol.

Ainsi, ces résultats montrent les différences caractéristiques de la disposition, de la fonction de la surface de vol et des paramètres aérodynamiques chez la mouche uzi et ils pourraient expliquer l'adaptation du vol du diptère. L'énergie cinétique des ailes nécessaire pour les oscillations des ailes est une fonction de la fréquence du battement de l'aile ; elle inclue aussi des paramètres dynamiques tels que le moment d'inertie, la vitesse angulaire et la vitesse angulaire. L'énergie cinétique est faible chez les mâles et élevée chez les femelles, ce qui montre que la consommation d'énergie pour maintenir les ailes en mouvement est élevée chez les femelles par comparaison aux mâles. Puisque la fréquence de battement de l'aile est élevée chez les mâles, la consommation d'énergie cinétique est faible. En conséquence, les mâles volent sur de plus longues distance que les femelles à partir du point d'émergence. Ceci est une observation importante du point de vue de la fécondité puisqu'un certain nombre de femelles vierges peuvent être fécondées avec succès dans différents lieux d'élevage, ce qui fait qu'en fin de compte un nombre maximum de récoltes de vers à soie seront abimées par le parasite. En général, la fréquence de battement de l'aile dépend du rapport entre le pouvoir du muscle de l'aile et la "résistance" (poids) de la charge. Les papillons aux grandes ailes et aux corps légers peuvent avoir une fréquence de battement de 4 à 20 battements par seconde (bps) tandis que les mouches et les abeilles aux petites ailes et aux corps lourds battent leurs ailes plus de 100 fois par seconde et les mustiques peuvent même battre leurs ailes jusqu'à 988 à 1046 fois par seconde (Suryanarayana Murty et coll., 1993). Dans cette étude, nous avons enregistré que la fréquence de battement de l'aile de la mouche uzi mâle et femelle est respectivement de 108,89 et 101,28. Cette information est très importante pour comprendre l'adaptation de la mouche uzi au vol.

SCREENING OF SILKWORM (*BOMBYX MORI*) GERMPLASM FOR RESISTANCE TO *BOMBYX MORI* DENSONUCLEOSIS VIRUS 1 (BmDNV1)

V. SIVAPRASAD, CHANDRASHEKHARAI AH, C. RAMESH, S. S. KUMARI,
C. R. REDDY, S. V. SESHAGIRI & D. VINEELA

Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute (APSSRDI),
Kirikera – 515 211, Hindupur, A. P., India.

Bombyx mori denisonucleosis virus 1 (BmDNV1) causes denisonucleosis in silkworms. A single recessive gene, *nsd-1*, in the 21st linkage group controls the complete resistance to BmDNV1. This paper reports on the identification of silkworm breeds resistant to BmDNV1 among the germplasm maintained at Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute (APSSRDI), Hindupur, India. The BmDNV1 infection in susceptible populations was confirmed using antibody to BmDNV1 (Japan & India) by Ouchterlony test. Among the 63 bivoltine and 70 multivoltine breeds screened, 19 bivoltine and 25 multivoltine breeds were resistant to BmDNV1.

Keywords: *Bombyx mori*, resistance, germplasm, BmDNV1.

Bombyx mori denisonucleosis virus1 (BmDNV1), which belongs to Class: Parvoviridae and Sub-class: Densoviridae causes denisonucleosis in silkworms. BmDNV1 is a spherical particle (23nm diameter) having ssDNA as its genome (1.7×10^6) and the viral coat protein is made up of four structural polypeptides (Nakagaki and Kawase, 1980a, 1980b). The denisonucleosis of silkworm is reviewed by Watanabe (1994). The prevalence of denisonucleosis reported in Japan is attributed to BmDNV1 (Ina strain) and BmDNV2 (Saku & Yamanashi strains) whereas the denisonucleosis reported in China is attributed to BmDNV2 (china strain). These have been designated as strains based on serological differences (Watanabe, 1994).

The prevalence of BmDNV1 incidence is widespread in all major sericultural areas of India including Andhra Pradesh, Karnataka and Tamil Nadu states and is estimated to an extent of 43%. The incidence of BmDNV1 recorded often is in association with BmIFV along with single infections (Sato, 1992; Sivaprasad *et al.*, 1993 & 1994). BmDNV1 in India was isolated, purified and identified subsequently by using anti-BmDNV1 serum obtained from Japan (Sivaprasad *et al.*, 1997).

The non-susceptibility (complete resistance) to BmDNV1 is controlled by a single recessive gene, *nsd-1*, located at 8.3 position on the 21st chromosome (Eguchi *et al.*, 1991). Similarly, the dominant gene, *nid-1* controlling the susceptibility to BmDNV1 infection was found (Eguchi *et al.*, 1986). The use of complete resistant varieties to DNV is attractive from the managerial and economic stand point of view as it requires no action for prevention of the disease during silkworm rearing. Per oral inoculation tests to identify the susceptible and resistant strains to BmDNV1 were reported by Watanabe and Maeda (1978; 1981). Furuta (1995) reported the genetic variability among the 456 races preserved in National Institute of Sericultural & Entomological Sciences (NISES) Japan to BmDNV1. 28 silkworm varieties were found to have resistance to BmDNV among the 200 races screened in China (Jiang *et al.*, 1997). A BmDNV resistant variety, Kong-1 was developed in China (Huang, 1986). The silkworm germplasm at Central Sericultural Research & Training Institute

(CSRTI), Mysore, India were screened and identified for their resistance to BmDNV1 (Sivaprasad *et al.*, 1997 and Sen *et al.*, 2000). This paper reports on the screening of silkworm germplasm maintained at Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute (APSSRDI), Hindupur, India for the resistance to BmDNV1.

MATERIALS AND METHODS

1. Materials:

(a) Propagation of BmDNV1: The BmDNV1 was propagated in a susceptible breed of silkworms, NB18 at regular intervals. The infected larvae were used for the preparation of BmDNV1 inoculum.

(b) Silkworm germplasm: 133 silkworm (63 bivoltine and 70 multivoltine) breeds maintained in the germplasm bank of Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute (APSSRDI), Hindupur, India were utilised for determining their resistance/susceptibility to BmDNV1.

2. Methods:

(a) Preparation of BmDNV1 inoculum: The midguts of BmDNV1 infected larvae were collected and pooled and homogenised in potassium phosphate buffer, pH 7.2 containing 0.85% NaCl (PBS; 9 ml/g = 10^{-1} dilution). The homogenate was centrifuged at 5000 rpm for 30 minutes at 4 °C. The supernatant was collected and filtered through 0.22 µm membrane filter. The filtrate is the BmDNV1 inoculum and stored at -20°C for further use.

(b) Screening of germplasm: Newly ecdysed III instar larvae were *per orally* inoculated with BmDNV1 (10^{-2}) dilution by smearing onto mulberry leaf (0.25 ml/25 sq. cm leaf / 25 larvae). The larvae were allowed to feed onto inoculum-smear leaf for 6 hrs. The larvae were reared under standard rearing conditions. The mortality due to BmDNV1 infection was recorded up to pupation. Simultaneously a mock-inoculated batch of each breed was maintained as control. A known susceptible breed, NB18, was also maintained as a check variety. In each batch 50 larvae were maintained in three replications. The BmDNV1 infections were confirmed by immunodiffusion test (Ouchterlony test) using anti-BmDNV1 serum (Japan and India). The quantitative cocoon characteristics i. e., single cocoon weight, single shell weight and shell ratio of resistant populations were assessed. The resistant population in each batch was collected and the moths emerged from survivors were processed for egg laying and further the eggs were used for reproducing the BmDNV1 resistant population.

RESULTS AND DISCUSSION

BmDNV1 inoculum: The BmDNV1 propagated at APSSRDI, Hindupur, India is serologically related to anti-BmDNV1 serum (Japan and India) as evidenced by formation of precipitin line in the immunodiffusion (Ouchterlony) test.

Resistance to BmDNV1:

Bivoltine Silkworm breeds: Among the 63 bivoltine silkworm breed screened, 5 oval cocoon (SPO, APSTO, SMO, APSO4 and 4TLO) and 14 peanut cocoon (NAP, NAB, SMC, GPC, KM1, APS4, APS8, SDD1, SDD5, TL1D, TL5D, TL1DM, TL5DM and 4TLD) breeds were found resistant to BmDNV1. The degree of resistant germplasm recovered on an average varied in different breeds. The resistant population recovered was maximum (39.67%) in APS4, followed by 33.33% in NAP and 30.67% in TL5D. It ranged between 20-30% in SPO, APSTO, SMO, APSO4, 4TLO, NAB, KM1, SDD1, SDD5, TL1D, TL1DM, TL5DM and 4TLD; 10-20% in GPC and APS8 and < 10% in SMC (Table I).

Table I. Characteristics of bivoltine silkworm breeds resistant to BmDNV1.

Tableau I. Caractéristiques des lignées de vers à soie bivoltins résistantes à BmDNV1.

Breed	Larval character	Cocoon colour	Resistance %	Cocoon Wt. (g)	Shell Wt. (g)	Shell Ratio (%)
Lignée	Caractère larvaire	Couleur du cocon		Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse (%)
<i>Oval Cocoon Type / Cocon ovale</i>						
SPO	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	20.67 ± 3.06*	1.638	0.315	19.23
APSTO	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	22.67 ± 4.16	1.574	0.316	20.18
SMO	Marked / <i>Marqué</i>	White / <i>Blanc</i>	24.33 ± 2.52	1.563	0.321	20.54
APSO4	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	20.67 ± 3.51	1.521	0.309	20.32
4TLO	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	29.00 ± 2.65	1.478	0.288	19.49
<i>Peanut Cocoon Type / Cocon de type cintré</i>						
NAP	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	33.33 ± 3.06	1.331	0.199	14.95
NAB	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	25.67 ± 2.52	1.255	0.219	17.45
SMC	Marked / <i>Marqué</i>	White / <i>Blanc</i>	8.67 ± 1.15	1.545	0.294	19.03
GPC	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	15.53 ± 3.06	1.658	0.307	18.52
KM1	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	24.33 ± 2.08	1.625	0.271	16.68
APS4	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	39.67 ± 2.52	1.120	0.175	15.63
APS8	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	15.67 ± 2.52	1.699	0.321	18.89
SDD1	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	23.33 ± 3.06	1.444	0.286	19.81
SDD5	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	29.67 ± 2.52	1.377	0.307	22.09
TL1D	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	26.33 ± 1.53	1.279	0.268	20.95
TL5D	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	30.67 ± 1.15	1.363	0.270	19.81
TL1DM	Marked / <i>Marqué</i>	White / <i>Blanc</i>	23.67 ± 3.21	1.376	0.285	20.71
TL5DM	Marked / <i>Marqué</i>	White / <i>Blanc</i>	27.33 ± 3.06	1.371	0.259	18.89
4TLD	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	25.33 ± 3.79	1.475	0.275	18.64
NB18	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanc</i>	0.00			

* Values represent mean of 3 replications ± S. D. / Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions ± l'écart type.

Table II. Characteristics of multivoltine silkworm breeds resistant to *BmDNV1*.Tableau II. Caractéristiques des lignées de vers à soie polyvoltins résistantes à *BmDNV1*.

Breed	Larval character	Cocoon colour	Resistance %	Cocoon Wt. (g)	Shell Wt. (g)	Shell Ratio (%)
<i>Lignée</i>	<i>Caractère larvaire</i>	<i>Couleur du cocon</i>		<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
Oval Cocoon Type / Cocon ovale						
CS2O-C	Plain / Uni	White / Blanc	22.33 ± 3.79*	0.927	0.113	12.19
CS2O-W	Plain / Uni	White / Blanc	23.67 ± 3.21	0.950	0.134	14.11
W. Oval	Plain / Uni	White / Blanc	19.00 ± 4.58	1.200	0.175	14.58
PM-AP	Plain / Uni	GY	23.00 ± 3.00	0.650	0.080	12.31
APM1	Plain / Uni	GY	18.00 ± 2.00	1.020	0.156	15.29
WOM	Plain / Uni	GY	45.67 ± 4.93	1.054	0.172	16.32
RON	Plain / Uni	Yellow / Jaune	33.00 ± 3.61	1.294	0.199	15.38
PWCW	Plain / Uni	White / Blanc	54.67 ± 3.61	1.002	0.179	17.86
ROSY	Plain / Uni	GY	16.67 ± 2.31	1.245	0.213	17.11
MDBHDY	Plain / Uni	GY	10.67 ± 3.06	1.027	0.150	14.61
CS2Y	Plain / Uni	GY	28.33 ± 4.93	1.034	0.165	15.96
SYPMYS	Plain / Uni	GY	23.33 ± 4.16	1.287	0.202	15.70
POCPROW	Plain / Uni	White / Blanc	30.67 ± 3.06	1.214	0.219	18.04
POPROW	Plain / Uni	White / Blanc	17.33 ± 3.06	1.138	0.189	16.61
PPOW	Plain / Uni	White / Blanc	7.67 ± 2.52	1.342	0.230	17.14
WOY	Plain / Uni	GY	30.67 ± 3.06	1.066	0.156	14.63
POWO	Plain / Uni	White / Blanc	24.33 ± 4.04	1.113	0.181	16.26
POCPO	Plain / Uni	White / Blanc	19.67 ± 2.08	1.172	0.202	17.24
CSWL	Plain / Uni	GY	30.67 ± 4.73	1.234	0.187	15.15

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

Breed	Larval character	Cocoon colour	Resistance %	Cocoon Wt. (g)	Shell Wt. (g)	Shell Ratio (%)
Lignée	Caractère larvaire	Couleur du cocon		Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse (%)
Peanut Cocoon Type / Cocon de type cintré						
MD1-C	Plain / Uni	Flesh / Chair	25.33 ± 5.03	1.004	0.131	13.05
MD2-P	Plain / Uni	White / Blanc	23.67 ± 4.04	1.279	0.181	14.15
MCRMC	Marked / Marqué	White / Blanc	36.67 ± 4.16	0.978	0.152	15.54
MDNB-PW	Plain / Uni	White / Blanc	28.00 ± 2.00	1.090	0.149	13.67
W. Dumbbell	Plain / Uni	White / Blanc	22.33 ± 2.52	1.023	0.137	13.39
MD1-Yellow	Marked / Marqué	Yellow / Jaune	37.00 ± 3.00	0.849	0.110	12.96
Pure Mysore	Plain / Uni	GY	0.00			

* Values represent mean of 3 replications ± S. D. / Les valeurs représentent une moyenne de 3 répétitions ± l'écart type.

GY = Greenish Yellow / Jaune vert.

The quantitative traits of resistant bivoltine silkworm breeds are as follows:

The single cocoon weight ranged between 1.12g (APS4) to 1.699g (APS8). The single cocoon shell weight was least (0.175g) in APS4 and highest (0.321g) in SMO and APS8. The shell ratio was around 20% in all the oval cocoon lines and it ranged between 14.95% in NAP and 22.09% in SDD5 among the peanut cocoon lines.

Multivoltine Silkworm breeds: A total of 25 multivoltine silkworm breeds (19 oval cocoon and 6 peanut cocoon) were found tolerant to BmDNV1 among the 70 breeds screened (Table II). The degree of resistant germplasm recovered on an average varied in both the peanut and oval cocoon breeds. The resistant population recovered was least (7.67%) in PPOW and maximum (54.67%) in PWCW followed by 45.67% in WOM. It ranged between 30-40% in RON, POCPROW, WOY, CSWL, MCRMC and MD1-Yellow; 20-30% in CS2-C, CS2-W, W. Oval, PM-AP, CS2Y, SYMPsy, POWO, MD1-C, MD2-P, MDNB-PW and W. Dumbbell; 10-20% in W. Oval, APM1, ROSY, POPROW and POCPO. The quantitative traits of resistant multivoltine silkworm breeds are as follows: The single cocoon weight was lowest (0.650g) in PM-AP and highest (1.342g) in PPOW. The single cocoon shell weight ranged between 0.080g in PM-AP and 0.230g in PPOW. The shell ratio ranged from 12.19% in CS2-C to 18.04% in POCPROW among the ovals, whereas it ranged between 12.96% in MD1 Yellow and 15.54% in MCRMC among peanut cocoon breeds.

Table III. Silkworm breeds susceptible to *BmNDV1*.

Tableau III. Lignées de ver à soie sensibles à *BmNDV1*.

Bivoltine breeds / Lignées bivoltines	
Oval	D43O, LPKO, HMT0, 9FO, GMO, GPO, TRO, AP1, AP2, AP3, AP7, AP8, AP9, AP10, CS3, KA, NB7, CC1, TL, TL10, TL50, SDO1, SDO2, SDO3, SDO4, SDO5
Peanut / Cintré	D43C, LPKC, HMTc, 9Fc, GMC, SMC2, CTV, KK1, KK2, AP4, AP5, AP6, NB1, SDD2, SDD3, SDD4, TLD
Multivoltine breeds / Lignées polyvoltines	
Oval	MCRMO, MCRPO-W, BL24, MDPTY, MDPRO, PRE, PEY, MDPWO, CSROP, CSPRMO, MDPMY, MDPMDY, MDPCY, Nistari, PM-K, PM-SL, PM-MU, MD2PO, POSY, SYMDBY, POPMW, CS2BL, POPOM, AAA, AAAA, POWBLO, POWSY, POPOW, PMWBL, HDY, POWBLE, ROWBL, SYLWBL, SYLWDL, MDBY, MCRPM-W
Peanut / Cintré	MDNB-MC, MDNB-PC, MDNB-MW, WD-M, WD-Y, MD2M, MD1CPL, MD1CD1, MDNB-CL, MDNB-CD1

Table IV. *BmDNV1* resistant and susceptible silkworm breeds maintained in APSSRDI germplasm.

Tableau IV. Lignées de vers à soie résistantes et sensibles à *BmDNV1* maintenues dans la banque génétique de l'APSSRDI.

Breed	Breeds Screened (No.)	Response to <i>BmDNV1</i>	Oval type	Peanut type
<i>Lignée</i>	<i>Lignées évaluées (nbre)</i>	<i>Réponse à <i>BmDNV1</i></i>	<i>Type ovale</i>	<i>Type cintré</i>
Bivoltines	63	Resistance / Résistance	5	14
		Susceptibility / Sensibilité	26	18
Multivoltines	70	Resistance / Résistance	19	6
		Susceptibility / Sensibilité	35	10

Susceptibility to BmDNV1: A total of 44 bivoltine (18 ovals and 14 peanut) and 45 multivoltine (35 ovals and 10 peanut) silkworm breeds were found susceptible to BmDNV1 (Table III). In case of the check varieties for bivoltine (NB18) and multivoltine (Pure Mysore), 100% mortality due to BmDNV1 was recorded.

The incidence of densovirus caused by BmDNV1 in India is estimated to an extent of 43% and occurs as single infection and also in association with BmIFV. It is not uncommon for the farmers losing crops frequently in the final instars and this is attributed to the incidence of BmDNV1. Since densovirus (flacherie) induces atypical symptoms and larval mortality is observed during the final instar and pupation, secondary contamination in early instars is the major factor for spreading of the BmDNV1 infection.

It is well established by Eguchi *et al.*, (1991) that the non-susceptibility (resistance) of silkworms to BmDNV1 is controlled by a recessive gene, *nsd-1*. This gene can be introduced to the silkworm through breeding for the development of disease resistant breeds (Watanabe, 1994). He further suggested that the practical rearing of silkworm varieties genetically resistant to BmDNVs is the best way for complete protection against epizootics of densovirus. Development of such disease resistant hybrids not only increases the cocoon productivity, but also results in consistent cocoon crops. Since BmDNV and BmIFV are synergistically infectious to the BmDNV susceptible varieties (Watanabe and Shimizu, 1981), rearing of resistant varieties to BmDNV seems to be effective for protection against BmIFV infection also. The identification of silkworm breeds resistant to BmDNV by per oral inoculation tests was established for the silkworm germplasm stocks at NISES (Japan, Furuta, 1995 and China; Jiang *et al.*, 1997). The early attempts in India in this direction were made by Sivaprasad *et al.*, (1997) as the identification of resistant genetic stocks is a pre-requisite for the development of more resistant or improved breeds/hybrids. The present study was made to screen the existing 133 germplasm stocks (63 bivoltine and 70 multivoltine breeds) at APSSRDI. It reveals that the silkworm germplasm at APSSRDI is rich with a total of 44 silkworm stocks, which are resistant to BmDNV1 and they consist of 19 bivoltine (5 oval cocoon lines and 14 peanut cocoon lines) and 25 multivoltine (19 oval and 6 peanut) silkworm breeds (Table IV). The silkworm germplasm stocks showing resistance to BmDNV1 are being used in the breeding programmes to develop productive silkworm breeds/hybrids having resistance to BmDNV1 suitable for ecoclimatic conditions of Andhra Pradesh in particular and India in general.

REFERENCES

- EGUCHI R., FURUTA Y. & NINAKI O. (1986) Dominant non-susceptibility to densovirus in the silkworm, *Bombyx mori* J. Seric. Sci. Jpn., 55: 177-178.
- EGUCHI R., NINAKI O. & HARA W. (1991) Genetical analysis on non-susceptibility to densovirus in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 60: 384-389.
- FURUTA Y. (1995) Susceptibility of the races of the silkworm, *Bombyx mori*, preserved in NISES to the nuclear polyhedrosis virus and densovirus. Bull. of the Natl. Inst. Of Seric. & Entomol. Sci., 0(15): 119-145.
- HUANG L. Q. (1986) Studies on the method of breeding of silkworm strains that can resist the disease of densovirus. Acta Sericology Sinica, 10(2): 87-90.
- JIANG Q., ZHIFANG Z., TAO C., ZHONGSHENG Y. & HAIZHEN X. (1997) Studies on breeding materials resistant to silkworm densovirus. Cane Kexue, 23(2): 99.
- NAKAGAKI M., KAWASE S. (1980a) DNA of a new parvo-like virus isolated from the silkworm *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., 35: 124-133.
- NAKAGAKI M., KAWASE S. (1980b) Structural proteins of densovirus isolated from the silkworm *Bombyx mori* infected with the flacherie virus. J. Invertebr. Pathol., 36: 166-171.
- SATO T. (1992) JICA Report, CSRTI, Mysore, India.

- SEN R., NATARAJU B., BALAVENKATASUBBAIAH M., PREMALATHA V., ANANTHALAKSHMI K. V. V., THIAGARAJAN V. & DATTA R. K. (2000) Susceptibility status of silkworm (*Bombyx mori*) germplasm stocks to *Bombyx mori* densovirus Type 1 and its inheritance of resistance. Natl. Conf. On Strategies for Sericulture Research and Development, CSRTI, Mysore, Abstr. No. SWI/0-8.
- SIVAPRASAD V., NATARAJU B., BAIG M. & SATO T. (1993) CSRTI Annual Report 1992-1993, CSRTI, Mysore, India.
- SIVAPRASAD V., NATARAJU B. & BAIG M. (1994) CSRTI Annual Report 1993-1994, CSRTI, Mysore, India.
- SIVAPRASAD V., NATARAJU B., ASHAN M. M. & DATTA R. K. (1997) Identification of silkworm breeds resistant to *Bombyx mori* densovirus 1 (BmDNV1). Current Tech. Seminar, CSRTI, Berhampore, India.
- WATANABE H. (1994) Densovirus of the silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 33(2): 114-117.
- WATANABE H., MAEDA S. (1978) Genetic resistance to per oral infection with a densovirus in the silkworm, *Bombyx mori* J. Seric. Sci. Jpn., 47: 209-214.
- WATANABE H., MAEDA S. (1981) Genetically determined non-susceptibility of the silkworm, *Bombyx mori*, to infection with a densovirus (densovirus). J. Invertebr. Pathol., 38: 370-373.

EVALUATION DE LA RESISTANCE DES LIGNEES DE VER A SOIE *BOMBYX MORI* AU VIRUS 1 DE LA DENSONUCLEOSE (BmDNV1)

V. SIVAPRASAD, CHANDRASHEKHARAI AH, C. RAMESH, S. S. KUMARI,
C. R. REDDY, S. V. SESHAGIRI & D. VINEELA

Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute (APSSRDI),
Kirikera – 515 211, Hindupur, Inde.

*Le virus 1 de la densonucléose de **Bombyx mori** entraîne la densonucléose chez les vers à soie. Un gène unique récessif, **nsd-1**, dans le 21^{ème} groupe de liaison contrôle la résistance complète à BmDNV1. Cet article rapporte l'identification de lignées de vers à soie résistantes à BmDNV1 dans les germoplasmes maintenus au **Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute (APSSRDI)**, à Hindupur, en Inde. L'infestation par BmDNV1 chez les populations sensibles est confirmée en utilisant un anticorps contre BmDNV1 (Japon & Inde) avec le test d'Ouchterlony. Parmi les 63 lignées bivoltines et les 70 lignées polyvoltines évaluées, 19 lignées bivoltines et 25 lignées polyvoltines se sont avérées résistantes à BmDNV1.*

Le virus 1 de la densonucléose de *Bombyx mori* (BmDNV1) qui appartient à la classe des Parvoviridae et à la sous-classe des Densoviridae entraîne la densonucléose chez les vers à soie. BmDNV1 est une particule sphérique (diamètre de 23nm) ayant un ADN simple lien ($1,7 \times 10^6$) et l'enveloppe de protéines virales est constituée de polypeptides structuraux (Nakagaki et Kawase, 1980a, 1980b). Watanabe (1994) a étudié la densonucléose du ver à soie. La densonucléose répandue au Japon est attribuée à BmDNV1 (souche Ina) et à BmDNV2 (souches Saku et Yamanashi) tandis que la densonucléose rapportée en Chine est attribuée à BmDNV2 (souche chinoise). Elles ont été distinguées comme souches en raison de leurs différences sérologiques (Watanabe, 1994).

BmDNV1 est répandu dans toutes les principales zones séricicoles en Inde y compris dans les états de l'Andhra Pradesh, du Karnataka et du Tamil Nadu et on estime son incidence à environ 43 %. On enregistre souvent BmDNV1 en association avec BmIFV mais il se produit également des infestations individuelles (Sato, 1992 ; Sivaprasad et coll., 1993 & 1995). BmDNV1 a été isolé, purifié et identifié en Inde par la suite en utilisant un sérum anti-BmDNV1 obtenu au Japon (Sivaprasad et coll., 1997).

L'insensibilité (résistance complète) à BmDNV1 est contrôlée par un gène récessif unique, *nsd-1*, situé à la position 8.3 sur le 21^{ème} chromosome (Eguchi et coll., 1991). De même, on a trouvé le gène dominant, *nid-1* qui contrôle la sensibilité à l'infestation BmDNV1 (Eguchi et coll., 1986). L'utilisation de variétés complètement résistantes à DNV est intéressante d'un point de vue pratique et économique car elle ne nécessite aucune action de prévention de la maladie pendant l'élevage du ver à soie. Watanabe et Maeda (1978, 1981) ont fait part de l'existence de tests d'inoculation oraux pour identifier les lignées sensibles et résistantes à BmDNV1. Furuta (1995) a mesuré la variabilité génétique de 456 races, conservées au *National Institute of Sericultural & Entomological Sciences (NISES)*, vis à vis de BmDNV1. On a constaté que 28 variétés de vers à soie sont résistantes à BmDNV1 parmi les 200 races évaluées en Chine (Jiang et coll., 1997). Une variété résistante à BmDNV, Kong-1, a été mise au point en Chine (Huang, 1986). Les germoplasmes du ver à soie du *Central Sericultural Research & Training Institute (CSRTI)* de Mysore en Inde, ont été évalués et identifiés par rapport à

leur résistance à BmDNV1 (Sivaprasad et coll., 1997 et Sen et coll., 2000). Cet article est consacré à l'évaluation de la résistance à BmDNV1 de germoplasmes de vers à soie conservés à l'Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute (APSSRDI) à Hindupur en Inde.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels :

(a) Propagation de BmDNV1 :

BmDNV1 est propagé chez une lignée sensible de vers à soie, NB18, à intervalles réguliers. Les larves infestées sont utilisées pour la préparation de l'inoculum de BmDNV1.

(b) Germoplasme de ver à soie :

133 lignées de ver à soie (63 bivoltines et 70 polyvoltines) maintenues dans la Banque Génétique de l'Andhra Pradesh State Sericulture Research & Development Institute (APSSRDI), à Hindupur, sont utilisées afin de déterminer leur résistance / sensibilité à BmDNV1.

2. Méthodes :

(a) Préparation de l'inoculum de BmDNV1 :

Les intestins moyens de larves infestées par BmDNV1 sont recueillis, regroupés et homogénéisés dans un tampon de phosphate de potassium, au pH de 7,2 contenant 0,85 % de NaCl (PBS ; 9 ml / g = dilution 10^{-1}). L'homogénat est centrifugé à 5000 tpm pendant 30 minutes à 4° C. Le surnageant est recueilli et filtré au travers d'une membrane à 0,22 µm. Le filtrat représente l'inoculum de BmDNV1 et est stocké à -20° C pour un usage ultérieur.

(b) Evaluation du germoplasme :

On inocule par voie orale des larves du 3^{ème} âge juste après l'ecdysis avec une dilution de BmDNV (10^{-2}) étalée sur une feuille de mûrier (0,25 ml / 25 cm² de feuilles / 25 larves). On laisse les larves se nourrir avec des feuilles enduites d'inoculum pendant 6 heures. Les larves sont élevées dans les conditions d'élevage habituelles. On enregistre la mortalité due à l'infestation par BmDNV1 jusqu'à la nymphose. Parallèlement, on maintient un lot pour chaque lignée comme témoin. On maintient aussi une lignée que l'on sait être sensible, NB18, comme variété témoin. On conserve 50 larves par lot avec trois répétitions. Les infestations BmDNV1 sont confirmées par le test d'immunodiffusion (test d'Ouchterlony) en utilisant un sérum anti-BmDNV1 (Japon et Inde). Nous évaluons les caractéristiques quantitatives du cocon, c'est à dire le poids d'un cocon, le poids de la coque soyeuse, et la richesse soyeuse des populations résistantes. La population résistante de chaque lot est recueillie et les papillons ayant émergé à partir des survivants sont utilisés pour la ponte et les œufs sont utilisés pour la reproduction de la population résistante à BmDNV1.

RESULTATS ET DISCUSSION

Inoculum de BmDNV1 :

Le BmDNV1 propagé à l'APSSRDI, à Hindupur en Inde est lié sérologiquement au sérum anti-BmDNV1 (Japon et Inde) comme le montre la formation d'une ligne de précipitat lors du test d'immunodiffusion (Ouchterlony)

Résistance à BmDNV1 :

Lignées de vers à soie bivoltines :

Parmi les 63 lignées bivoltines évaluées, 5 lignées à cocon ovale (SPO, APSTO, SMO, APSO4 et 4TLO) et 14 lignées cintrées (NAP, NAB, SMC, GPC, KM1, APS4, APS8, SDD1, SDD5, TL1D, TL5D, TL1DM, TL5DM, et 4TLD) s'avèrent résistantes à BmDNV1. Le degré de résistance moyenne varie chez les différentes lignées. La population résistante enregistrée est maximum (39,67 %) chez

APS4, suivie par 33,33 % chez NAP et 30,67 % chez TL5D. Elle est comprise entre 20 à 30 % chez SPO, APSTO, SMO, APSO4, 4TLO, NAB, KM1, SDD1, SDD5, TL1D, TL1DM, TL5DM, et 4 TLD ; 10 à 20 % chez GPC et APS8 et est inférieure à 10 % chez SMC (Tableau I).

Les traits quantitatifs des lignées de vers à soie bivoltines résistantes sont les suivants :

Le poids individuel du cocon est compris entre 1,12 g (APS4) et 1,699 g (APS8). Le poids de la coque soyeuse est inférieur (0,175 g) chez APS4 et le plus élevé (0,321 g) est celui de SMO et d'APS8. La richesse soyeuse se situe autour de 20 % chez toutes les lignées de cocons ovales et elle est comprise entre 14,95 % chez NAP et 22,09 % chez SDD5 pour les lignées de cocon cintrées.

Lignées de vers à soie polyvoltines :

Un ensemble de 25 lignées polyvoltines (19 à cocons ovales et 6 à cocons cintrés) parmi les 70 lignées évaluées s'avèrent tolérer BmDNV1 (Tableau II). Le degré de résistance varie en moyenne à la fois chez les lignées cintrées et ovales. La population résistante est la plus faible (7,67 %) chez PPOW et elle est maximum (54,67 %) chez PWCW suivie par 45,67 % chez WOM. Elle est comprise entre 30 et 40 % chez RON, POCPROW, WOY, CSWL, MCRMC et MD1-jaune ; 20 à 30 % chez CS2-C, CS2-W, W. ovale, PM-AP, CS2Y, SYMPSY, POWO, MD1-C, MD2-P, MDNB-PW et W. Dumbbell ; 10 à 20 % chez W. Oval, APM1, ROSY, POPROW et POCPO. Les traits quantitatifs des lignées de ver à soie polyvoltines sont les suivants : le poids du cocon est le plus faible (0,650 g) chez PM-AP et le plus élevé (1,342 g) chez PPOW. Le poids de la coque est compris entre 0,080 g chez PM-AP et 0,230 g chez PPOW. La richesse soyeuse est comprise entre 12,19 % chez CS2-C et 18,04 % chez POCPROW parmi les lignées ovales de cocons tandis qu'elle est comprise entre 12,96 g chez MD1 jaune et 15,54 % chez MCRMC parmi les lignées de cocons cintrés.

Sensibilité à BmDNV1 :

Un ensemble de 44 lignées de vers à soie bivoltines (18 ovales et 14 cintrées) et 45 polyvoltines (35 ovales et 10 cintrées) s'avèrent sensibles à BmDNV1 (Tableau III). Dans le cas des variétés témoins on enregistre 100 % de mortalité avec BmDNV1 pour les lignées bivoltines (NB18) et polyvoltines (Pure Mysore).

On estime l'incidence de la denosnucléose provoquée par BmDNV1 à 43 % en Inde et elle a lieu soit en tant qu'infestation individuelle soit en association avec BmIFV. Il n'est pas rare pour les fermiers de perdre des récoltes aux derniers âges et on attribue cela à l'incidence de BmDNV1. Puisque la denosnucléose (la flacherie) induit des symptômes atypiques et qu'on observe une mortalité larvaire pendant le dernier âge et la nymphose, la contamination secondaire aux premiers âges est le facteur principal de diffusion de l'infestation du BmDNV1.

Eguchi et coll., ont clairement établi (1991) que l'insensibilité (la résistance) des vers à soie à BmDNV1 est contrôlée par un gène récessif, *nsd-1*. Ce gène peut être introduit chez le ver à soie par croisement lors de la mise au point de lignées résistantes à la maladie (Watanabe, 1994). Il a par ailleurs suggéré que, dans la pratique, l'élevage de variétés de vers à soie génétiquement résistantes à BmDNV est la meilleure façon d'assurer une protection complète contre les épizooties de denosnucléose. La mise au point de tels hybrides résistants à la maladie augmente non seulement la productivité des cocons mais donne aussi des récoltes de cocons consistantes. Puisque BmDNV et BmIFV sont synergétiquement infectieux envers les variétés sensibles à BmDNV (Watanabe et Shimizu, 1981), l'élevage de variétés résistantes à BmDNV semble être aussi efficace en matière de protection contre l'infestation par BmIFV. On a procédé à l'identification de lignées de vers à soie résistantes à BmDNV par des tests d'inoculation orale chez les souches de germoplasmes du ver à soie du NISES (Japon, Furuta, 1995 et Chine ; Jiang et coll., 1997). Les premiers essais qui ont été faits en Inde dans cette direction sont ceux de Sivaprasad et coll., (1994) puisque l'identification de souches résistantes est la condition nécessaire pour la mise au point de lignées / hybrides plus résistants. Cette étude a été réalisée pour évaluer les 133 souches du germoplasme existant (63 lignées

bivoltines et 70 bivoltines) à l'APSSRDI. Elle révèle que les germoplasmes de ver à soie de l'APSSRDI contiennent 44 souches de vers à soie résistantes à *BmDNV1*, soit 19 lignées de vers à soie bivoltines (5 lignées à cocon ovale et 14 lignées à cocon cintré) et 25 lignées polyvoltines (19 ovales et 6 cintrées) (Tableau IV). Les souches des germoplasmes de ver à soie présentant une résistance à *BmDNV1* sont utilisées dans les programmes de lignage pour mettre au point des lignées / hybrides du ver à soie productifs et résistants à *BmDNV1*, qui sont adaptés tout d'abord aux conditions économiques et climatiques de l'Andhra Pradesh et plus généralement à celles de l'Inde.

THE EFFECT OF "SERI GUARD" ON REARING PERFORMANCE AND LOSS DUE TO DISEASES IN SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

P. VENKATARAMANA¹, N. SURYANARAYANA² & R. K. DUTTA³

1. Research Extension Centre, Central Silk Board, Vikarabad – 501 101, Andhra Pradesh, India.

2. Regional Sericultural Research Station, Raphadu, Post Box No. 50, Anantapur, Andhra Pradesh, India.

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

In the present investigation a bivoltine pure race of silkworm, *Bombyx mori* L. (NB4D2) was selected to study the larval duration, effective rate of rearing (ERR%), larval weight, cocoon weight, shell weight, shell ratio and occurrence of grasserie and flacherie diseases in different seasons, i. e. summer, rainy and winter after oral administration of Seri Guard (0.1% aqueous extract of plant psoralea, *Psoralea coryleifolia*, Karpuragam), prepared by S. V. Chemicals, Kolar, India through mulberry leaves. It was observed that the larval and cocoon characters were significantly enhanced in treated batches with the extract of *P. coryleifolia* in three seasons compared to the control batches. Incidence of grasserie and flacherie diseases were also significantly reduced in treated batches compared to the controls in all the seasons. However, the reduction in incidence of grasserie is more significant than that of flacherie disease in all the seasons. These findings suggest that the improvement in larval and cocoon characters and the prevention of the incidence of grasserie and flacherie diseases in silkworm rearing are possible by feeding 800-1000 ppm of Seri Guard during three different seasons.

Keywords: *Bombyx mori*, Seri Guard (*P. coryleifolia*), larval duration, larval weight, ERR %, cocoon weight, shell weight, shell ratio, flacherie, grasserie.

INTRODUCTION

Different antibiotics and growth stimulating factors are extensively used to enrich the nutrients of farm and other animals for increasing their productivity. In the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. also similar studies were carried out by different workers by feeding the enriched mulberry leaves with small quantities of different antibiotics (Sharada and Bhat, 1956; Radha *et al.*, 1981; Baig *et al.*, 1990), inorganic compounds (Mujumdar, 1982) and plant based antiviral aqueous extract of *Psoralea coryleifolia*, Karparagam, (Sivaprakasam and Rabindra, 1996) who found a significant improvement in the larval weight, fecundity, silk content and reduction in grasserie disease during summer season.

It was reported that the viral disease "grasserie" and bacterial disease "flacherie" were found to occur in all the months in Kolar and Bangalore districts of Karnataka, India (Benjamin *et al.*, 1997). In silkworms, *B. mori* L. maximum damage is caused by flacherie (28.3%) and grasserie (18.2%) which account for 15-20% crop loss in terms of cocoon yield (Benjamin *et al.*, 1997). Several methods were employed to prevent the diseases by using bed disinfectants, such as Resham Keet Oushad (RKO) (Samson *et al.*, 1987) and Vijetha (Datta *et al.*, 1998) and feeding leaves treated with antibiotics in silkworm, *B. mori* L. (Baig *et al.*, 1990). The only report by Baig *et al.*, (1990) revealed the effect of antibiotics on rearing performance and loss due to diseases in silkworm, *B. mori* L. in

different seasons i.e., summer, rainy and winter. Sivaprakasam and Rabindra (1996) reported that the grasserie disease was significantly reduced in silkworm *B. mori* L. by oral administration of the extract of *P. coryleifolia* during summer season. Since no information was available on the effect of Seri Guard (aqueous extract of *P. coryleifolia*) on the rearing performance and occurrence of diseases in silkworm, *B. mori* L. in three different seasons an attempt was made to study the effect of four different concentrations of Seri Guard on the rearing performance and occurrence of diseases in bivoltine pure silkworm, *B. mori* L. (NB4D2) in three seasons i. e., summer, rainy and winter under tropical climatic conditions.

MATERIALS AND METHODS

The larvae of the bivoltine pure race of silkworm, *Bombyx mori* L. (NB4D2) was used as test insects in the present investigation. Four grams of newly hatched silkworm larvae were reared under standard laboratory conditions adopting general rearing methods described by Krishnaswami (1978). The experimental larvae after second moult were counted and five replications of 500 larvae each were maintained for each treatment. Four different concentrations of Seri Guard (0.1% aqueous extract of plant, *Psoralea coryleifolia* L. (Karpuragam) prepared by S. V. Chemicals, Kolar (India), i. e., 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm and 1000 ppm were prepared in distilled water. Leaves of *P. coryleifolia* (8g) were macerated separately with a small quantity of distilled water in a glass pestle and mortar and then passed through a double layer of muslin cloth and final volume made upto one litre. This was diluted further ten times using distilled water containing 0.1 per cent teepol to get a suspension of 800 ppm. Freshly harvested mulberry leaves were soaked in these botanical treatments for 10 minutes and shade dried for 30 minutes before feeding. The treated leaves were fed to the silkworms once during III, IV and V instars. Then the silkworms were fed with untreated leaves. The control group fed with untreated mulberry leaves was maintained for comparison with treated batches. During every feeding the diseased larvae were identified and recorded in both the treatment and control and the data was subjected to the following formula to derive percentage incidence of diseases as:

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

The experiment was conducted at the Research Extension Centre, Central Silk Board, (Kolar, India) during three different seasons i.e., summer, rainy and winter under tropical climatic conditions. The data pertaining to larval duration, ERR%, larval weight, single cocoon and shell weights, shell ratio and percent incidence of diseases were recorded and analysed statistically by using the Two way analysis of variance test (Snedecor and Cochran, 1967) to derive the statistical significance.

RESULTS

The data on the effect of feeding of different concentrations of Seri Guard on the economic of the pure race of silkworm, *Bombyx mori* L. (NB4D2) in different three seasons are presented in Table I-III.

Larval duration and larval weight:

The data presented in Table I indicate that in all three seasons the duration of larval period upto the start of spinning was shortened with all the concentrations of Seri Guard. The maximum reduction in larval period was obtained with 1000 ppm in all three seasons (i. e. in summer: -4%; rainy: -3.98%; winter: -6.22%) when compared to that of the other treatments and controls. The maximum weight of 10 larvae was recorded with 1000 ppm in all three seasons (i. e., in summer: 9.75%; rainy: 4.75%;

winter: 7.35%) followed by 800 ppm (i. e., in summer 8.22%; rainy: 4.38%; winter 5.58%), 600 ppm and 400 ppm. However, the values obtained for this character with the concentrations of 800 ppm, 600 ppm and 400 ppm were on par with the control.

Table I. Effect of feeding Seri Guard on larval characters and ERR (seasons wise).

Tableau I. Effet de l'administration de "Seri Guard" sur les caractères larvaires et l'ERR (en fonction des saisons).

Dosage of Seri Guard (ppm)	Season	Larval Duration (days – hrs)	% difference	Weight of 10 larvae (g)	% difference	ERR %	% difference
<i>Dose de Seri Guard (ppm)</i>	<i>Saison</i>	<i>Durée larvaire (jours – hrs)</i>	<i>Différence %</i>	<i>Poids de 10 larves (g)</i>	<i>Différence %</i>	<i>% ERR</i>	<i>Différence %</i>
400	Summer / <i>Eté</i>	24.02	–3.92	34.00	6.25	86.20	45.85
	Rainy / <i>Pluies</i>	27.02	–0.22	41.00	2.50	89.80	14.21
	Winter / <i>Hiver</i>	30.08	–6.06	34.60	1.77	92.65	14.55
600	Summer / <i>Eté</i>	24.00	–4.00	34.60	8.13	89.50	51.44
	Rainy / <i>Pluies</i>	27.03	–0.18	41.60	4.00	93.30	18.65
	Winter / <i>Hiver</i>	30.03	–6.22	35.70	5.00	94.25	14.18
800	Summer / <i>Eté</i>	24.00	–4.00	34.75	8.22	91.50	54.82
	Rainy / <i>Pluies</i>	27.03	–0.18	41.75	4.38	93.25	18.60
	Winter / <i>Hiver</i>	30.03	–6.22	35.90	5.58	95.00	17.45
1000	Summer / <i>Eté</i>	24.00	–4.00	35.12	9.75	94.56	60.00
	Rainy / <i>Pluies</i>	26.00	–3.98	41.90	4.75	94.57	20.27
	Winter / <i>Hiver</i>	30.03	–6.22	36.50	7.35	96.26	19.02
Control <i>Témoin</i>	Summer / <i>Eté</i>	25.00	-	32.00	-	59.10	-
	Rainy / <i>Pluies</i>	27.08	-	40.00	-	78.63	-
	Winter / <i>Hiver</i>	32.02	-	34.00	-	80.88	-
Dosage S.E		0.198	-	0.190	-	0.850	-
<i>Ecart type Dose</i>							
CD at 5%		0.490	-	0.490	-	1.684	-
Season S. E.		0.122	-	0.112	-	0.602	-
<i>Ecart type Saison</i>							
C. D. at 5%		0.299	-	0.280	-	1.650	-

ERR: Effective Rate of Rearing / *Taux effectif d'Élevage.*

Table II. Effect of feeding Seri Guard on cocoon characters (season wise).

Tableau II. Effet de l'administration de "Seri Guard" sur les caractères du cocon (en fonction de la saison).

Dosage of Seri Guard (ppm)	Season	Single / Individuel					
		Cocoon weight (g)	% difference	Shell weight (g)	% difference	Shell ratio (%)	% difference
<i>Dose de Seri Guard (ppm)</i>	<i>Saison</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Différence %</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Différence %</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Différence %</i>
400	Summer / Eté	1.697	5.40	0.324	3.85	19.09	1.49
	Rainy / Pluies	1.875	15.74	0.358	15.48	19.14	0.00
	Winter / Hiver	1.730	4.72	0.340	13.34	19.66	8.26
600	Summer / Eté	1.693	4.51	0.366	17.31	21.62	11.55
	Rainy / Pluies	1.823	12.53	0.399	28.71	21.89	14.36
	Winter / Hiver	1.750	5.93	0.360	20.00	20.57	13.37
800	Summer / Eté	1.663	2.65	0.390	25.00	23.45	21.00
	Rainy / Pluies	1.975	21.90	0.399	28.71	22.98	28.71
	Winter / Hiver	1.768	7.02	0.393	31.00	23.16	27.53
1000	Summer / Eté	1.744	7.65	0.397	27.25	22.79	17.50
	Rainy / Pluies	1.980	22.22	0.419	35.16	22.47	17.39
	Winter / Hiver	1.780	7.75	0.396	32.00	22.12	21.80
Control <i>Témoin</i>	Summer / Eté	1.610	-	0.312	-	19.38	-
	Rainy / Pluies	1.620	-	0.310	-	19.14	-
	Winter / Hiver	1.625	-	0.300	-	18.16	-
Dosage S. E. <i>Ecart type Dose</i>		0.018	-	0.008	-	0.025	-
C. D. at 5% Season S. E. <i>Ecart type Saison</i>		0.049	-	0.016	-	0.018	-
		0.0108	-	0.004	-	1.999	-
C. D. at 5%		0.032	-	0.0196	-	0.520	-

Cocoon weight, shell weight and shell ratio:

It is evident from the results (Table II) that Seri Guard used in this study elicited a positive influence in silk production. Though many of the treatments appeared to have exerted substantial influence on silkworm, the maximum improvement in cocoon weight was observed in 1000 ppm treatment during all the seasons (i. e. in summer: 7.65%; rainy: 22.22%; winter: 7.75%) more than with the other treatments and controls. Similar to cocoon weight, shell weight was also improved substantially by Seri Guard. The maximum improvement in shell weight was recorded with 1000 ppm during all the seasons (i. e. in summer: 27.25%; rainy: 35.16%; winter: 32%) followed by 800 ppm,

600 ppm and 400 ppm treatments. Similar to cocoon and shell weights, the maximum improvement in shell ratio was also recorded in 800 ppm treatment in all the seasons (i. e. in summer, 21%; rainy: 28.71%; winter: 27.53%) followed by 1000 ppm (i. e. in summer: 17.5%; rainy: 17.39%; winter: 21.8%).

Table III. Effect of feeding Seri Guard on incidence of loss due to diseases (season wise).

Tableau III. Effet de l'administration de "Seri Guard" sur l'incidence des pertes dues aux maladies (en fonction de la saison).

Dosage of Seri Guard (ppm)	Season	Disease % / % de Maladie				
		Grasserie	% difference	Flacherie	% difference	Total
<i>Dose de Seriguard (ppm)</i>	<i>Saison</i>		<i>Différence %</i>		<i>Différence %</i>	
400	Summer / Eté	4.60	-84.80	9.20	-13.10	13.80
	Rainy / Pluies	2.60	-74.31	7.60	-32.45	10.20
	Winter / Hiver	3.40	-60.00	3.95	-62.80	7.35
600	Summer / Eté	3.75	-87.60	6.75	-36.62	10.50
	Rainy / Pluies	2.20	-78.26	4.50	-60.00	6.70
	Winter / Hiver	1.25	-85.30	4.50	-60.00	5.75
800	Summer / Eté	3.00	-90.08	5.50	-48.35	8.50
	Rainy / Pluies	2.15	-78.75	4.60	-59.11	6.75
	Winter / Hiver	2.00	-76.47	3.00	-71.75	5.00
1000	Summer / Eté	0.95	-96.86	4.49	-57.85	5.44
	Rainy / Pluies	0.45	-95.56	4.98	-55.73	5.43
	Winter / Hiver	0.15	-98.23	3.59	-66.20	3.74
Control <i>Témoin</i>	Summer / Eté	30.25	-	10.65	-	40.90
	Rainy / Pluies	10.12	-	11.25	-	21.37
	Winter / Hiver	8.50	-	10.62	-	19.12
Dosage S. E.		0.915	-	0.640	-	-
<i>Dose Ecart type</i>						
C. D. at 5%		2.150	-	1.765	-	-
Season S. E.		0.420	-	0.420	-	-
<i>Saison Ecart type</i>						
C. D. at 5%		1.520	-	1.220	-	-

Effective rate of rearing (ERR), incidence of grasserie and flacherie diseases:

Among the concentrations of Seri Guard, the maximum ERR was recorded with 1000 ppm in all three seasons (i. e. in summer: 60%; rainy: 20.27%; winter: 19.02%) followed by 800 ppm, 600 ppm and 400 ppm. Similar to the increase in ERR%, the reduction in the grasserie and flacherie diseases was maximum with 1000 ppm and 800 ppm (Table III) in all the three seasons studied. The loss in the incidence of both the diseases was observed with all the concentrations in all the seasons. The reduction in the incidence of grasserie disease was maximum at all the concentrations of Seri Guard more than the reduction in flacherie disease during all the three seasons studied.

DISCUSSION

Rate of development and viability are some of the parameters to evaluate the effect of any chemical or physical agent (Sankaranarayana, 1969; Gayathri and Krishnamurthy, 1979) and plant foliage constituents (Keating et al., 1990). The parameters analysed in the present investigation herald the effect of the growth regulators and viability in silkworm, *B. mori* L.

In this case, the authors observed a reduction in larval duration and an increase in larval weight, shell weight and shell ratio with oral administration of mulberry leaves soaked in 400, 600, 800 and 1000 ppm concentrations of Seri Guard in different seasons. It is emphasised that the Seri Guard accelerates the growth and development of silkworm through orientation of physiological activity and thereby reduces the larval duration and increases the silk content in the cocoon (Sivaprakasam and Rabindra, 1996). Reduced larval period will be advantageous as this will minimise the larval mortality and enhance the ERR. Literature on the efficacy of oral administration of extracts of botanicals on larval and cocoon characters was absolutely scant. The effect of Seri Guard in enhancing the economic characters in different seasons are in confirmation with the findings of Rajashekar Gowda (1991), who reported that the extract of *P. coryleifolia* and *T. terrestris* enhanced the economic characters of *B. mori* L. The growth promoting effect of the botanicals was also reported by Murugan et al., (1998) who observed that the treatment of *B. mori* L. with botanicals, i. e., *P. coryleifolia* and *T. terrestris* increased the silk gland, cocoon weight and silk ratio. Sivaprakasam and Rabindra (1996) reported that aqueous leaf extract of *P. coryleifolia* increased the silk gland, cocoon weight and silk ratio. Sivaprakasam and Rabindra (1996) reported that aqueous leaf extract of *P. coryleifolia* increased the cocoon characters.

The overall study revealed that the oral administration of mulberry leaf supplemented with 800-1000 ppm aqueous extract of *P. coryleifolia* (Seri Guard) as a feed to the silkworm, *B. mori* L. during three different seasons i. e., summer, rainy and winter under tropical climatic conditions found to be effective in reducing the larval period, increasing the larval weight, survival rate and cocoon characters and also in preventing the occurrence of both grasserie and flacherie diseases.

REFERENCES

- BAIG M., NATARAJU B., SAMSON M. V. (1990) Studies on the effect of antibiotics on rearing performance and loss due to diseases in silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 29(1): 54-58.
- BENCHAMIN K. V., VENKATARAMANA P., THIMMANAIK S., SANATH KUMAR Y. N. (1997) Pest and diseases occurrence in mulberry and silkworm: A Survey. Indian Silk, 36(2): 27-32.
- DATTA R. K., BAIG M., NATARAJU B., BALAVENKATASUBBAIAH M., SELVAKUMAR T. (1998) Vijetha: An Effective Disinfectant. Indian Silk, 1: 12-13.
- GAYATHRI M. V., KRISHNAMURTY N. B. (1979) Differential sensitivity of different species of *Drosophila* to ceresan – a mercurial fungicide. Ind. J. Exp. Biol., 17(4): 433-435.
- KEATING S. T., HUNTER H. D., SCHULTZ J. C. (1990) Leaf phenolic inhibition of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus and role of polyhedral inclusion body aggregation. J. Chem. Ecol., 16: 1445-1457.

- KRISHNASWAMI S. (1978) New Technology of silkworm rearing, CSRTI, Mysore (India), Bulletin No. 2, pp: 1-23.
- MUJUMDAR A. C. (1982) Notes on the physiological effects on the growth and reproduction of silkworm fed on mulberry leaves soaked in Potassium iodide. Indian J. Agric. Sci., 52(4): 250-252.
- MURUGAN K., JEYABALAN D., SENTHIL KUMAR N., SENTHIL NATHAN S., SIVAPRAKASAM N. (1998) Growth promoting effect of plant products on silkworm – A biotechnological. Journal of scientific and Industrial Research, 57(11): 740-745.
- RADHA N. V., NATARAJAN T., MUTHUKRISHNAN T. S. OBLISAMI S. (1981) Effect of antibiotics on the growth and productivity of mulberry silkworms, proceedings of sericulture symposium and seminar 1980 TNAU, Coimbatore, 173-177 pp.
- RAJASHEKAR GOWDA (1991) Studies on methods to increase silk yield of *Bombyx mori* L. Ph. D. Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 242 pp.
- SAMSON M. V., BAIG M., JOLLY M. S. (1987) "Resham Keet Oushad", A prospective bed disinfectant against grasserie and muscardine. Indian Silk, 25(11): 16-18.
- SANKARNARAYANA K. (1969) The effect of nitrogen and oxygen frequency of x-ray induced dominant lethals and the physiology of the sperms in *Drosophila melanogaster*. Mut. Res., 4: 641- 661.
- SHARADA K. & BHAT J. V. (1956) Effect of chloromycetin and glycine on the growth and production of silk by *Bombyx mori* L. J. Indian Inst. Sci. 1: 21-26.
- SIVAPRAKASAM N. & RABINDRA R. J. (1996) Integrated Disease Management methods for grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 35(2): 122-127.
- SNEDECOR W. G. & COCHRAN G. W. (1967) In: Statistical methods. Ed. Oxford and IBH publications, India.

EFFET DU "SERI GUARD" SUR LA PERFORMANCE D'ELEVAGE ET LA PERTE DUE AUX MALADIES CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

P. VENKATARAMANA¹, N. SURYANARAYANA² & R. K. DUTTA³

1. Research Extension Centre, Central Silk Board, Vikarabad-501 101, Andhra Pradesh, Inde.
2. Regional Sericultural Research Station, Rappthadu, Post Box No. 50, Anantapur, Andhra Pradesh, Inde.
3. Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore-570 008, Inde.

Dans cette étude, une race bivoltine pure du ver à soie *Bombyx mori* L. (NB4D2) a été sélectionnée pour étudier la durée larvaire, le taux effectif d'élevage (% ERR), le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et l'incidence des maladies de la grasserie et de la flacherie pendant différentes saisons, c'est à dire en été, pendant les pluies et en hiver après l'administration orale de *Seri Guard* (0,1 % d'extrait aqueux de la plante, *Psoralea coryleifolia*, Karpuragam préparé par S. V. Chemicals, à Kolar, en Inde) par les feuilles de mûrier. On observe que les caractères de la larve et du cocon s'améliorent de manière significative chez les lots traités avec l'extrait de *P. coryleifolia* pendant les trois saisons par comparaison aux lots témoins. On observe aussi une diminution significative de l'incidence de la grasserie et de la flacherie chez les lots traités par comparaison aux témoins à toutes les saisons. Cependant, la diminution de l'incidence de la grasserie est plus importante que celle de la flacherie. Ces observations suggèrent qu'il est possible d'améliorer les caractères de la larve et du cocon et de prévenir l'incidence des maladies de la grasserie et de la flacherie dans l'élevage du ver à soie grâce à l'administration de 800 à 1000 ppm de *Seri Guard* pendant les différentes saisons.

INTRODUCTION

On a largement recours à différents antibiotiques et agents de stimulation de la croissance pour enrichir les substances nutritives des animaux de ferme ou d'autres animaux et améliorer la productivité. Plusieurs chercheurs ont réalisé des études similaires chez le ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. en enrichissant les feuilles de mûrier avec de petites quantités de différents antibiotiques (Sharada et Bhat, 1956 ; Radhal et coll., 1981 ; Baig et coll., 1990), de composés inorganiques (Majumdar, 1982) et avec un extrait aqueux antiviral à base de plante *Psoralea coryleifolia* Karparagam (Sivaprakasam et Rabindra, 1996), lesquels ont observé une amélioration significative du poids larvaire, de la fécondité, de la teneur en soie et une atténuation de la maladie de la grasserie pendant l'été.

On a rapporté que des éruptions de la maladie virale de la grasserie et de la maladie bactérienne de la flacherie surviennent pendant n'importe quel mois dans les régions de Kolar et de Bangalore dans le Karnataka, en Inde (Benchamin et coll., 1997). Chez les vers à soie *B. mori* L., la flacherie (28,3 %) et la grasserie (18,2 %) entraînent des dégâts maximum qui représentent une perte de rendement lors des récoltes de cocons de l'ordre de 15 à 20 % (Benchamin et coll., 1997). Plusieurs méthodes sont employées pour prévenir les maladies, l'utilisation de désinfectants de litière, tels que le Resham Keet Oushad (Rko) (Samson et coll., 1987) et le Vijetha (Datta et coll., 1998), ou l'alimentation des vers à soie, *B. mori* L. avec des feuilles traitées avec des antibiotiques (Baig et

coll., 1990). Seul le rapport de Baig et coll., (1990) présente l'effet des antibiotiques sur la performance d'élevage et sur les pertes provoquées par les maladies chez le ver à soie, *B. mori* L. pendant différentes saisons, c'est à dire en été, pendant la saison des pluies et en hiver. Sivaprakasam et Rabindra (1996) ont rapporté que la maladie de la grasserie diminue de manière significative chez le ver à soie *B. mori* L. grâce à l'administration orale d'extrait de *P. coryleifolia* pendant l'été. Puisqu'il n'existe aucune information sur l'effet du *Seri guard* (extrait aqueux de *P. coryleifolia*) par rapport à la performance d'élevage et à l'éruption des maladies chez le ver à soie *B. mori* L. pendant trois saisons différentes, nous avons essayé d'étudier l'effet de quatre concentrations différentes de *Seri Guard* sur la performance d'élevage et l'incidence des maladies chez le ver à soie bivoltin *B. mori* L. (NB4D2) au cours de trois saisons, c'est à dire en été, pendant la saison des pluies et en hiver dans des conditions de climat tropical.

MATERIELS ET METHODES

Les larves de la race pure bivoltine du ver à soie, *Bombyx mori* L. (NB4D2) sont utilisées comme insectes d'expérimentation dans cette étude. Quatre grammes de larves de vers à soie venant d'éclore sont élevés dans des conditions habituelles de laboratoire en adoptant les méthodes d'élevage générales décrites par Krishnaswami (1978). On compte les larves d'expérimentation après la deuxième mue et on maintient 5 répétitions de 500 larves chacune pour chaque traitement. Quatre concentrations différentes de *Seri Guard* (0,1 % d'extrait aqueux de la plante de *Psoralea coryleifolia* L. (Karpuragam) préparé par S. V. Chemicals, Kolar (Inde), c'est à dire 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm et 1000 ppm sont préparées dans de l'eau distillée. On laisse les feuilles de *P. coryleifolia* (8 g) macérer séparément avec une petite quantité d'eau distillée dans un mortier avec un pilon en verre puis on les passe au travers d'un tissu de mousseline double pour faire un volume final d'un litre. On dilue encore dix fois en utilisant de l'eau distillée contenant 0,1 pourcent de *Teepol* pour faire une suspension à 800 ppm. Des feuilles de mûrier fraîchement récoltées sont trempées dans ces traitements botaniques pendant 10 minutes et séchées à l'ombre pendant 30 minutes avant le nourrissage. On donne les feuilles traitées en nourriture aux vers à soie une fois aux 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} âges. Puis les vers à soie sont nourris avec des feuilles non traitées. Le groupe témoin est nourri avec des feuilles de mûrier non traitées. A chaque nourrissage, on identifie et on enregistre les larves malades à la fois chez les lots traités et les témoins et la formule suivante est utilisée pour calculer le pourcentage d'incidence des maladies :

$$\% \text{ d'incidence de la maladie} = \frac{\text{Nbre de larves malades}}{\text{Nbre total de larves testées}} \times 100$$

L'expérience a été réalisée au *Research Extension Centre*, du *Central Silk Board* (à Kolar, en Inde) pendant trois saisons différentes, c'est à dire en été, pendant la saison des pluies et en hiver dans des conditions climatiques tropicales. Les données concernant la durée larvaire, le taux effectif d'élevage (ERR), le poids larvaire, les poids du cocon et de la coque, la richesse soyeuse et le pourcentage d'incidence des maladies sont enregistrées et analysées de manière statistique en utilisant le test d'analyse de variance à deux facteurs (Snedecor et Cochran, 1967).

RESULTATS

Les données sur l'effet du nourrissage de la race pure du ver à soie, *Bombyx mori* L. (NB4D2) avec différentes concentrations de *Seri Guard* pendant trois saisons différentes sont présentées dans les Tableaux I à III.

Durée larvaire et poids larvaire :

Les données présentées dans le Tableau I indiquent que la durée larvaire jusqu'au début du filage raccourcit avec toutes les concentrations de *Seri Guard* pour les trois saisons. On obtient la diminution maximum de la durée larvaire avec 1000 ppm pendant les trois saisons (c'est à dire en été : - 4 % ; pendant la saison des pluies - 3,98 % ; en hiver : - 6,22 %). On enregistre le poids maximum pour 10 larves avec 1000 ppm pendant les trois saisons (c'est à dire en été : 9,75 % ; pendant la saison des pluies : 4,75 % ; en hiver : 7,35 %) suivi par 800 ppm (c'est à dire, en été 8,22 % ; pendant la saison des pluies : 4,38 %, en hiver : 5,58 %), 600 ppm et 400 ppm. Cependant, les valeurs obtenues pour ce caractère avec les concentrations de 800 ppm, 600 ppm et 400 ppm sont égales à celles du témoin.

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

Il est évident d'après les résultats (Tableau II) que le *Seri Guard* utilisé dans cette étude a une influence positive sur la production de soie. Bien que beaucoup de traitements semblent exercer une influence remarquable sur le ver à soie, on observe l'amélioration maximum du poids du cocon avec le traitement à 1000 ppm pendant toutes les saisons (c'est à dire en été : 7,65 % ; pendant la saison des pluies : 22,22 % ; en hiver : 7,75 %) plus qu'avec les autres traitements et les témoins. Comme pour le poids du cocon, le poids de la coque s'améliore aussi de manière substantielle avec le *Seri Guard*. On obtient l'amélioration maximum du poids de la coque avec 1000 ppm pendant toutes les saisons (c'est à dire en été : 27,25 % ; pendant la saison des pluies 35,16 % ; en hiver : 32 %) suivi par les traitements à 800 ppm, 600 ppm et 400 ppm. Comme pour les poids du cocon et de la coque, on enregistre aussi l'amélioration maximum de la richesse soyeuse avec le traitement à 800 ppm pendant toutes les saisons (c'est à dire en été : 21 %, pendant la saison des pluies : 28,71 % ; en hiver : 27,53 %) suivi par 1000 ppm (c'est à dire en été : 17,5 % ; pendant la saison des pluies : 17,39 % ; en hiver : 21,8 %).

Taux effectif d'élevage (ERR) et incidence des maladies de la grasserie et de la flacherie :

On enregistre l'ERR maximum avec 1000 ppm de *Seri Guard* pendant les trois saisons (c'est à dire en été : 60 % ; pendant la saison des pluies : 20,27 % ; en hiver : 19,02 %) suivi par 800 ppm, 600 ppm et 400 ppm. Comme pour l'augmentation du % ERR, la diminution des maladies de la grasserie et de la flacherie est maximum avec 1000 ppm et 800 ppm (Tableau III) pendant les trois saisons étudiées. On observe la diminution de l'incidence des deux maladies avec toutes les concentrations pendant toutes les saisons. La diminution de l'incidence de la maladie de la grasserie est maximum avec toutes les concentrations de *Seri Guard* plus que la diminution de la maladie de la flacherie pendant les trois saisons étudiées.

DISCUSSION

Le taux de développement et la viabilité sont certains des paramètres d'évaluation de l'effet d'un agent chimique ou physique (Sankaranarayana, 1969 ; Gayathri et Krishnamurthy, 1979) et des constituants foliaires de la plante (Keating et coll., 1990). Les paramètres analysés dans cette étude reflètent l'effet des régulateurs de croissance et la viabilité chez le ver à soie *B. mori* L.

Nous avons observé une diminution de la durée larvaire et une augmentation du poids larvaire, du poids de la coque et de la richesse soyeuse avec l'administration orale de feuilles de mûrier trempées dans des concentrations de 400, 600, 800 et 1000 ppm de *Seri guard* pendant différentes saisons. Nous attirons l'attention sur le fait que le *Seri Guard* accélère la croissance et le développement du ver à soie par l'orientation de l'activité physiologique et donc par là même il diminue la durée larvaire et augmente la teneur en soie du cocon (Sivaprakasam et Rabindra, 1996). La diminution de la durée larvaire est avantageuse car elle minimise la mortalité larvaire et améliore l'ERR. La littérature sur l'efficacité de l'administration orale d'extraits botaniques sur les caractères de la larve et du cocon est complètement inexistante. L'effet d'amélioration des caractères

économiques pendant différentes saisons avec le *Seriguard* confirme les observations de Rajashekar Gowda (1991) qui ont rapporté que l'extrait de *P. coryleifolia* et de *T. terrestris* améliore les caractères économiques chez *B. mori* L. L'effet de promotion de la croissance des substances botaniques a aussi été rapporté par Murugan et coll., (1998) qui ont aussi observé que le traitement de *B. mori* L. avec des substances botaniques, c'est à dire avec *P. coryleifolia* et *T. terrestris* augmente le poids de la glande séricigène, le poids du cocon et la richesse soyeuse. Sivaprakasam et Rabindra (1996) ont rapporté que l'extrait foliaire aqueux de *P. coryleifolia* augmente le poids de la glande séricigène, du cocon et la richesse soyeuse. Sivaprakasam et Rabindra (1996) ont rapporté que l'extrait foliaire aqueux de *P. coryleifolia* améliore les caractères du cocon.

Dans son ensemble, l'étude révèle que le nourrissage du ver à soie *B. mori* L. avec des feuilles de mûrier ayant reçu 800 à 1000 ppm d'extrait aqueux de *P. coryleifolia* (Seri Guard) pendant trois saisons différentes, c'est à dire en été, pendant la saison des pluies et en hiver dans les conditions climatiques tropicales s'avère efficace pour diminuer la durée larvaire, augmenter le poids larvaire, le taux de survie et les caractères du cocon et aussi pour prévenir l'éruption des maladies de la grasserie et de la flacherie.

THE CROSS INFECTIVITY BETWEEN PATHOGENS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. AND MULBERRY LEAF ROLLER, *DIAPHANIA PULVERULENTALIS* (HAMPSON)

S. D. SHARMA, K. CHANDRASEKHARAN, B. NATARAJU,
M. BALAVENKATASUBBAIAH, T. SELVAKUMAR, V. THIAGARAJAN & S.B. DANDIN

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

In the present study, natural population of leaf roller, *Diaphania pulverulentalis*, a major mulberry pest, was screened for the presence of different pathogenic microbes and studies on their cross infectivity in silkworm and vice versa have been carried out. The pathogenicity of isolated microbes from diseased / dead larvae of *D. pulverulentalis* was confirmed by its inoculation in healthy specimen of the insect and development of the specific infection by inoculated pathogen as per Koch's postulates. Results indicate that out of 1,000 larvae screened, 85 larvae were infected with microbes. The isolated microbes were identified as Nuclear Polyhedrosis Virus, Microsporidia (3 types), *Beauveria bassiana* (fungus), *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Bacillus* sp. of bacteria. Out of the infected larvae in *D. pulverulentalis*, 29.41 % were infected with microsporidia, 10.58 % with nuclear polyhedral bodies, 43.23 % with *B. bassiana* and 11.76 % with different species of bacteria. The pathogenic microbes isolated from *D. pulverulentalis* i. e. microsporidian, *B. bassiana* and Bacteria caused mortality of 66-80 %, 100 % and 12-28 % respectively in silkworm, establishing the cross infectivity of these pathogens. Significance of the findings from present study in relation to the persistence and spread of pathogens in silkworm rearing environment are discussed.

Keywords: *Diaphania pulverulentalis*, *Beauveria bassiana*, Microsporidia, Nuclear polyhedra, Bacteria, cross infectivity, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

Silkworm diseases constitute a major constraint in achieving high productivity in silkworm rearing. In India, 30 - 40% loss in cocoon production due to diseases was reported by Vaidya (1960). To control the diseases in silkworm, various measures like proper chemical disinfection of rearing house and maintenance of hygienic conditions are followed. However, despite the above mentioned preventive measures, the disease incidence is not completely under control. This is mainly due to harbouring and dissemination of pathogens by other insect pests of mulberry and horticultural crops and its spread to silkworm. Sharma *et al.*, (1989) reported the presence of various pathogenic microbes in Bihar hairy caterpillar, *Diacrisia obliqua*, a major pest of mulberry. The cross infection of pathogens thus add one more dimension in the dispersal and persistence of pathogens in the rearing environment. Recently, a serious outbreak of an insect pest, mulberry leaf roller, *Diaphania pulverulentalis* has been reported causing severe damage to the mulberry crop from sericultural areas of Karnataka, Andhra Pradesh and Tamil Nadu states of India (Rajadurai *et al.*, 1999). It is, therefore, considered worth while to carry out a general screening of leaf roller, *Diaphania pulverulentalis* for the presence of various pathogens and the cross infectivity of different pathogens of *Diaphania pulverulentalis* to silkworm, *Bombyx mori* L. and vice versa.

MATERIALS AND METHODS

Collection of leaf roller from field and isolation of microbes:

Over 1,000 dead/live larvae of *Diaphania pulverulentalis* were collected from mulberry garden in Mysore, Bangalore and Kolar districts of Karnataka and examined in the laboratory for microbes primarily for Polyhedrosis virus, Infectious flacherie virus (IFV), Densonucleosis virus (DNV), *Beauveria bassiana*, Microsporidia and Bacteria. Polyhedral bodies, Microsporidian spores and Bacteria were examined by microscopic inspection and serodiagnosis was followed for Infectious flacherie virus and Densonucleosis virus.

Isolation and purification of bacteria and *B. bassiana* were carried out following culture method using nutrient agar and Samsinokova's culture media respectively. Polyhedra and microsporidian spores were isolated and purified by differential centrifugation and the infectious flacherie virus and densonucleosis virus by gradient centrifugation.

Screening of isolated microbes from *D. pulverulentalis* for their infectivity to silkworm:

The larvae of *D. pulverulentalis* were reared in silkworm pathology laboratory under aseptic condition and used for experimentation. Aqueous suspension of seven microbes i. e., Nuclear polyhedrosis virus, Microsporidia, *Beauveria bassiana*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Bacillus* sp. bacteria isolated from *D. pulverulentalis* was prepared and the stock suspension was diluted to obtain inoculum of 1×10^7 units/ml (Unit means Polyhedral Occlusion Bodies in case of Nuclear polyhedrosis, spores in case of Microsporidia, conidia in case of *B. bassiana* and bacterial cells in case of different types of Bacteria). The *B. bassiana* inoculum was applied topically on the leaf roller larvae whereas the other microbes were smeared separately on tender mulberry leaf @ 1 ml / 100 sq cm leaf area and fed to second instar larvae of *D. pulverulentalis* which has come out of first moult. The dead larvae were examined for the presence of inoculated pathogen to determine its pathogenicity as per Koch's postulates. The microbes pathogenic to *D. pulverulentalis* confirmed as per Koch's postulates were tested for their pathogenicity to silkworm. The inoculation of pathogen in silkworm was done in two batches, one in just hatched larvae and the other immediately after I moult. Three replications each of 50 larvae were maintained for individual pathogen.

Screening of silkworm pathogens for infectivity to *D. pulverulentalis*:

The pathogens isolated from silkworm, *Bombyx mori* L. i. e. *Nosema bombycis* (Microsporidian), *B. bassiana* (Fungus) and BmNPV (Virus), were tested against leaf roller, *D. pulverulentalis* for their pathogenicity. Suspension of the pathogen was prepared in distilled water and diluted to obtain an inoculum of 1×10^7 units/ml. In case of *B. bassiana*, the inoculum was applied topically on the larvae of *D. pulverulentalis* whereas *Nosema bombycis* spores and Nuclear polyhedral bodies were inoculated *per os* through smearing the inoculum on mulberry leaf @ 1 ml/100 sq cm of tender mulberry leaf. The inoculation was done in all the three instars of leaf roller i. e., immediately after hatching, after I moult and after II moult. The larvae were reared till pupation at $26 \pm 1^\circ \text{C}$ and 70 - 80 % RH. The mortality due to infection by specific pathogen was recorded.

RESULTS

The results of the study are presented in the Table I - III. It was observed that 85 of the 1,000 larvae of *D. pulverulentalis* were infected by microbes. The isolated microbes were identified as Nuclear polyhedrosis virus, *Beauveria bassiana*, Microsporidians (3 types), *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Bacillus* sp. bacteria. The results of screening of wild population of *D. pulverulentalis* for the occurrence of various pathogens are shown in Table I. Data shows that 43.23 % of the dead/diseased larval samples were found to be infected with *B. bassiana* (Fig.1 - b & c), 29.41 % of the dead / diseased larvae were infected with microsporidia (Fig.2 - a & b), whereas

Nuclear polyhedral bodies (Fig.3) were present in 10.58 % of larval samples tested. Different species of bacteria were found infecting 11.76 % of samples and none of the larval samples revealed the presence of IFV and DNV.

Table I. Pathogens isolated from natural population of leaf roller, *Diaphania pulverulentalis*.

Tableau I. Pathogènes isolés sur la population naturelle de l'enrouleur de la feuille *Diaphania pulverulentalis*.

No. of dead / diseased larvae	<i>Microsporidia</i>		<i>B. bassiana</i>		NPV		Bacteria	
<i>Nbre de larves mortes / malades</i>	<i>Microsporidies</i>						<i>Bactéries</i>	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
85	25	29.41	41	43.23	9	10.58	10	11.76

* A total of 1,000 larvae were screened / On a analysé un total de 1 000 larves.

Table II. Cross infectivity of different microbes isolated from *Diaphania pulverulentalis* to silkworm, *Bombyx mori* L.

Tableau II. Infectiosité croisée de différents microbes isolés chez *Diaphania pulverulentalis* pour le ver à soie *Bombyx mori* L.

Microbes	Dosage		Average Percent Mortality Pourcentage Moyen de Mortalité	
	Dose		I instar 1er âge	II instar 2ème âge
NPV	1×10^7 POB*/ml		0.00	0.00
Microsporidia-1 / <i>Microsporidies</i> 1	1×10^7 Spores/ml		80.00	66.00
Microsporidia-2 / <i>Microsporidies</i> 2	1×10^7 Spores /ml		0.00	0.00
Microsporidia-3 / <i>Microsporidies</i> 3	1×10^7 Spores /ml		0.00	0.00
<i>B. bassiana</i>	1×10^7 Conidia/ml		100.00	100.00
<i>Streptococcus</i> sp.	1×10^7 Cells/ml / 1×10^7 cellules / ml		28.00	16.00
<i>Micrococcus</i> sp.	1×10^7 Cells /ml / 1×10^7 cellules / ml		0.00	0.00
<i>Staphylococcus</i> sp.	1×10^7 Cells /ml / 1×10^7 cellules / ml		0.00	0.00
<i>Bacillus</i> sp.	1×10^7 Cells /ml / 1×10^7 cellules / ml		16.00	12.00

*POB = Polyhedral Occlusion Bodies / Corps d'occlusion polyédraux.

In each experimental batch, 50 larvae were kept. / On a conservé 50 larves dans chaque lot expérimental.

Table III. Cross infectivity of different silkworm pathogens to leaf roller, *Diaphania pulverulentalis*.

Tableau III. Infectiosité croisée de différents pathogènes du ver à soie pour l'enrouleur de la feuille *Diaphania pulverulentalis*.

Pathogens	Dosage	Average Percent Mortality		
		I instar	II instar	III instar
		Pourcentage Moyen de Mortalité		
<i>Pathogènes</i>	<i>Dose</i>	<i>1er âge</i>	<i>2ème âge</i>	<i>3ème âge</i>
BmNPV	1 X 10 ⁷ POB*/ml	0.00	0.00	0.00
<i>N. bombycis</i>	1 X 10 ⁷ Spores/ml	80.00	65.00	60.00
<i>B. bassiana</i>	1 X 10 ⁷ Conidia/ml	100.00	100.00	100.00

*POB = Polyhedral Occlusion Bodies / Corps d'occlusion polyédraux.

In each experimental batch, 50 larvae were kept./ Dans chaque lot expérimental, on conserve 50 larves.



Fig. 1. *Diaphania pulverulentalis* larvae.

a. Live larva.

b. *B. bassiana* infected dead larva before mummification.

c. Mummified dead larva.

Fig. 1. Larves de *Diaphania pulverulentalis*.

a. Larves vivantes.

b. Larves mortes infestées par *B. bassiana* avant la mummification.

c. Larves mortes mummifiées.

The results on the cross infection of pathogenic microbes from *D. pulverulentalis* to silkworm, *Bombyx mori* L are presented in Table II. Study shows the presence of 3 types of microsporidian spores (Microsporidia -1 : 3.86 x 2.57 µm ; Microsporidia -2 : 5.14 x 1.67 µm and Microsporidia -3:

2.83 x 1.24 μm). Microsporidia-1 was morphologically similar to the *N. bombycis* of silkworm (Fig.2 - a, b & c) and caused infection. However, the other microsporidia- 2 & 3 did not multiply in silkworm. The pathogenic microsporidian caused infection in silkworm to an extent of 80 % in first instar and 66.00 % in second instar larvae. The conidia of *B. bassiana* isolated from *D. pulverulentalis* caused

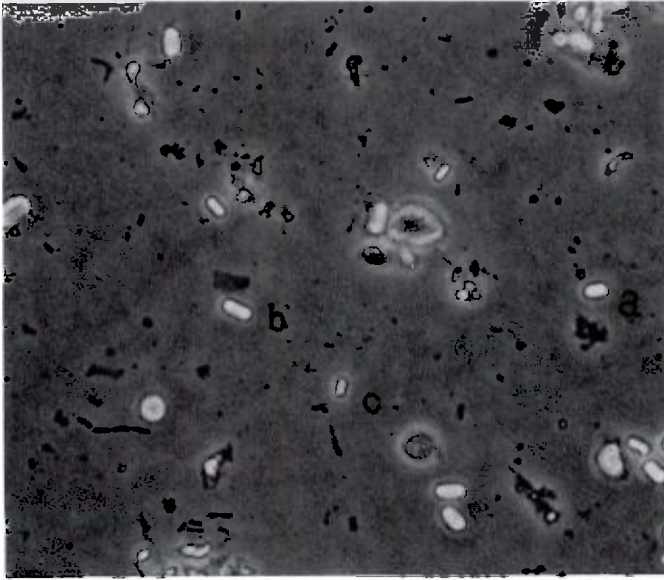


Fig. 2. Microsporidian spores from *D. pulverulentalis*.

- a. Microsporidia - 1.
- b. Microsporidia - 2.
- c. Microsporidia - 3.

Fig. 2. Spores microsporidiennes de *D. pulverulentalis*

- a. Microsporidies - 1.
- b. Microsporidies - 2.
- c. Microsporidies - 3.

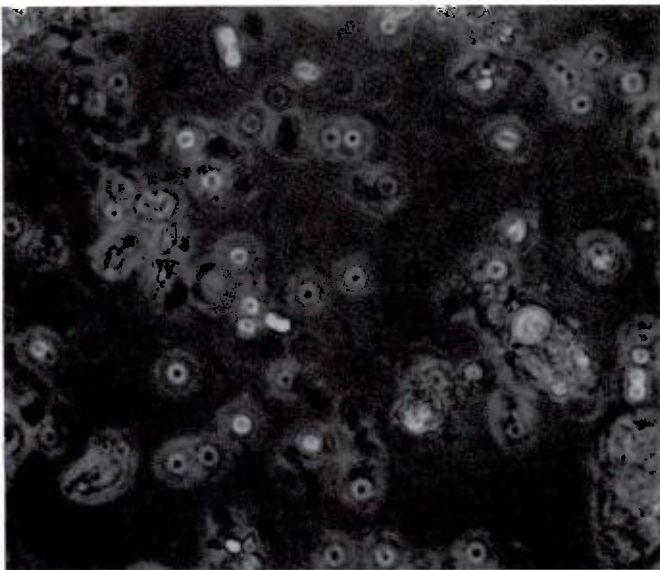


Fig. 3. Polyhedral bodies from *D. pulverulentalis* haemolymph.

Fig. 3. Corps polyédraux dans l'hémolymph de *D. pulverulentalis*.

100 % mortality in 1st and 2nd instar silkworm larvae. *Streptococcus* and *Bacillus* sp. bacteria isolated from *D. Pulverulentalis* resulted in 28.00 and 16.00 % mortality in first instar larvae and 16.00 and 12.00 % during second instar silkworm larvae respectively. However, *Staphylococcus* and *Micrococcus* sp. bacteria did not cause any mortality in silkworm larvae.

The results of screening of silkworm pathogens against *D. pulverulentalis* are presented in Table III. It is observed that BmNPV do not cause infection in *D. pulverulentalis* whereas *N. bombycis* and *B. bassiana* were highly pathogenic to *D. pulverulentalis*. *N. bombycis* caused 60 - 80 % infection in 1st, 2nd and 3rd instar larvae of *D. pulverulentalis*. *B. bassiana* of silkworm caused 100 % mortality due to muscardine in all the stages of *D. pulverulentalis*.

DISCUSSION

The observations made in the present study clearly establish that *D. pulverulentalis* harbour microbes pathogenic to silkworm. Among them, one is a microsporidian morphologically similar to *N. bombycis*. Geetha Bai *et al.* (1999) reported that *D. pulverulentalis* is susceptible to *Nosema bombycis* Nageli, the causative pathogen of pebrine disease in silkworm in the laboratory conditions. The present findings are therefore, in conformity with the results reported earlier. The findings of the present study, that the diseased samples in wild population of *D. pulverulentalis* were infected with microsporidia suggest that the pest is a potential source of secondary contamination of pathogenic microbes to silkworm, *Bombyx mori* L. through mulberry leaf, which in turn can transmit the diseases. The cross infectivity of *Nosema bombycis* from mulberry silkworm, *Bombyx mori* to lepidopteran and other insect pests has been reported by a number of authors. *Nosema bombycis* is known to infect several insects from different orders like Diptera (45 species), Lepidoptera (25 species), Ephemeroptera (13 species) and Hymenoptera (6 species) etc. (Steinhaus, 1949). Cross infectivity of *Nosema bombycis* was studied on different insect pests like Turnip moth (*Agrotis segetum* Schiff), Heart and Dart Moth (*A. eximatis* L.), Cotton Noctuid moth (*Heliothis armigera*), Army worm (*Spodoptera exigua* Hb), Cabbage White moth (*P. brassicae*). In all the above species, the infected larvae died before adulthood except *H. armigera* (Kashkarova, 1981). A microsporidian isolated from the cabbage butterfly *Pieris rapae*, was pathogenic to silkworm and the rate of infection were 20.0 % to 51.3 % (Zheng *et al.*, 1996). This report of a microsporidian from mulberry pest *D. pulverulentalis* which infect silkworm is of great significance in view of the fact that the pest has wide spread infestation in vast sericultural areas of India. Pebrine caused by *Nosema bombycis* is among the most dangerous diseases in silkworm and has the history of wiping out the sericulture industry in several European countries in the past.

Apart from the microsporidian, the fungus *B. Bassiana* of white muscardine of silkworm have been isolated from wild population of *D. pulverulentalis*. This observation is of great significance considering the alarming rate of spread of the disease and the cross infectivity of the pathogen from *Bombyx mori* to *D. pulverulentalis* and vice versa. It may be one of the reason for the high incidence of white muscardine in silkworm during rainy and winter seasons as high infestation of *D. pulverulentalis* in mulberry is also reported during these seasons.

Contrary to the cross infectivity of *Nosema bombycis* to *Diaphania pulverulentalis*, other pathogen tested i. e. BmNPV, was not found to cross infect *D. pulverulentalis* which shows that viruses show considerable specificity to its host. However, the diseased samples collected from wild population of *Diaphania pulverulentalis* revealed the presence of nuclear polyhedral bodies in some of the samples. The nuclear polyhedrosis viruses are generally host specific and as such other species may not infect silkworm, *Bombyx mori* L. However, there are distinct possibilities of using NPV isolated from *D. pulverulentalis* as a potential biological control agent against the pest, which may be explored.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors wish to thank Dr. T. Kawarabata, JICA Expert, Silkworm Pathology for his valuable suggestions and guidance.

REFERENCES

- GEETHA BAI M. and RAMEGOWDA T. (1999) Susceptibility of Leaf Roller pest of mulberry, *Diaphania (Margaronia) pulverulentalis* to *Nosema bombycis* due to secondary contamination. *Sericologia*, 39 (2) : 325 - 328.
- KASHKAROVA L. F. (1981) Nosematosis of the silkworm. *Zashchita Rostenil*, 9 : 29.
- RAJADURAI S., MANJUNATH D., KATIYAR R. L., PRASAD K.S., SEN A.K., SEKHAR M.A., AHSAN M.M. and DATTA R.K. (1999) Leaf roller- Serious pest of mulberry. *Indian Silk*, 37(12) : 9 - 11.
- SHARMA S. D., BALAVENKATASUBBAIAH M. and BAIG M. (1989) A report on the presence of various pathogenic microbes in a wild population of Bihar hairy caterpillar, *Diacrisia obliqua*. *Current Science*, 58 : 762 - 763.
- STEINHAUS E. A. (1949) *Principles of Insect Pathology*, McGraw Hill Book Co. Inc., 709.
- VAIDYA M. J. (1960) *Indian Sericulture - Problems of Modernisation* popular Brochure, CSB, Bombay, India. pp.33.
- ZHENG Y.M., QIONG Y., HUANG B.H., WANG S.C., LIAO S.Y., FANG D.J., HUANG Y.G. and NONG C.Z. (1996) Studies on the pathogenicity of microsporidia isolated from cabbage butterfly to silkworm, *Bombyx mori* L. *Seric. Sci. facing 21st cent. Int. Symp. Seric. Sci. Hangzhou China*. Pp-53 (abstract).

INFECTIOSITE CROISEE DES PATHOGENES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. ET DE CEUX DE L'ENROULEUR DE LA FEUILLE DE MURIER *DIAPHANIA PULVERULENTALIS* (HAMPSON)

S. D. SHARMA, K. CHANDRASEKHARAN, B. NATARAJU,
M. BALAVENKATASUBBAIAH, T. SELVAKUMAR, V. THIAGARAJAN &
S. B. DANDIN

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

Dans cette étude, nous avons évalué la population naturelle de l'enrouleur de la feuille, *Diaphania pulverulentalis*, un parasite majeur du mûrier pour y déterminer la présence de différents pathogènes et étudier leur infectiosité croisée chez le ver à soie et inversement. La pathogénicité de microbes isolés sur des larves malades / mortes de *D. pulverulentalis* est confirmée par l'inoculation dans des spécimens sains de l'insecte et le développement de l'infection spécifique par le pathogène inoculé selon les postulats de Koch. Les résultats indiquent que sur 1000 larves passées en revue, 85 larves sont infestées par des microbes. Nous avons identifié les micro-organismes suivants : le virus de la polyédrose nucléaire, les microsporidies (3 types), *Beauveria bassiana* (champignon), et des bactéries sp. *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus*. Sur les larves infestées de *D. pulverulentalis*, 29,41 % sont infestées par des microsporidies, 10,58 % par des corps polyédraux nucléaires, 43,23 % par *B. bassiana* et 11,76 % par différentes espèces de bactéries. Les microbes pathogènes isolés chez *D. pulverulentalis*, c'est à dire les microsporidies, *B. bassiana* et les bactéries entraînent une mortalité respectivement de 66 à 80 %, 100 % et 12 à 28 % chez le ver à soie, ce qui prouve l'infectiosité croisée de ces pathogènes. Nous discutons de la signification des observations relevées par rapport à la persistance et à la propagation des pathogènes dans l'environnement d'élevage du ver à soie.

INTRODUCTION

Les maladies du ver à soie constituent un obstacle majeur à une productivité élevée dans l'élevage du ver à soie. En Inde, Vaidya (1960) a rapporté une perte de production en cocons de l'ordre de 30 à 40 % à cause des maladies. La lutte contre les maladies du ver à soie passe par des mesures variées comme la désinfection chimique correcte de la magnanerie et le maintien de conditions d'hygiène. Cependant, les mesures préventives mentionnées ci-dessus, ne permettent pas de lutter complètement contre l'incidence des maladies. Cela vient du fait que d'autres insectes parasites du mûrier et des cultures horticoles hébergent et répandent des pathogènes qui se propagent chez le ver à soie. Sharma et coll., (1989) ont rapporté la présence de microbes pathogènes variés chez la chenille poilue du Bihar, *Diacrisia obliqua*, un parasite majeur du mûrier. Ainsi, l'infectiosité croisée des pathogènes ajoute une dimension supplémentaire à la propagation et à la pathogénicité dans l'environnement d'élevage. Il s'est récemment produit une infestation sévère due au parasite de l'enrouleur de la feuille, *Diaphania pulverulentalis* qui a provoqué des dégâts importants chez le mûrier dans les zones séricicoles des états du Karnataka, de l'Andhra Pradesh et du Tamil Nadu en Inde (Rajadurai et coll., 1999). Nous avons pensé qu'il était pertinent de réaliser une évaluation générale des pathogènes variés

présents sur l'enrouleur de la feuille *Diaphania pulverulentalis* et de l'infectiosité croisée des différents pathogènes de *Diaphania pulverulentalis* chez le ver à soie *Bombyx mori* L. et inversement.

MATERIELS ET METHODES

Recueil de l'enrouleur de la feuille sur le terrain et isolement des microbes :

Plus de 1000 larves mortes / vivantes de *Diaphania pulverulentalis* sont recueillies dans des mûraies dans les zones de Mysore, Bangalore et Kolar dans le Karnataka et on les examine en laboratoire pour déceler la présence de microbes principalement du virus de la polyédrose, du virus de la flacherie infectieuse (IFV), du virus de la densonucléose (DNV), de *Beauveria bassiana*, des microsporidies et des bactéries. On examine les corps polyédraux, les spores microsporidiennes et les bactéries au microscope et on a recours au sérodiagnostic pour le virus de la flacherie infectieuse et le virus de la densonucléose.

On procède à l'isolement et à la purification des bactéries et de *B. bassiana* en suivant une méthode de culture qui utilise respectivement un milieu agar et des milieux de culture de Samsinokova. On isole et on purifie les spores des polyèdres et des microsporides par centrifugation différentielle et le virus de la flacherie infectieuse et le virus de la densonucléose par centrifugation sur gradient.

Evaluation des microbes isolés sur *D. pulverulentalis* par rapport à leur infectiosité chez le ver à soie :

Les larves de *D. pulverulentalis* sont élevées dans un laboratoire de pathologie du ver à soie dans des conditions aseptisées et utilisées pour l'expérimentation. On prépare une suspension aqueuse de sept microbes, c'est à dire du virus de la polyédrose nucléaire, des microsporidies, de *Beauveria bassiana*, des bactéries *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus* sp., isolées sur *D. pulverulentalis* et la suspension mère est diluée pour obtenir un inoculum de 1×10^7 unités / ml (corps d'occlusion polyédraux moyens unitaires dans le cas de la polyédrose nucléaire, spores dans le cas des microsporidies, conidies dans le cas de *B. bassiana* et cellules bactériennes dans le cas des différents types de bactéries). L'inoculum de *B. bassiana* est appliqué de manière topique sur les larves de l'enrouleur de la feuille tandis que les autres microbes sont enduits séparément sur une feuille de mûrier tendre (à raison de 1 ml / 100 cm² de surface foliaire), qui est donnée en nourriture aux larves de *D. pulverulentalis* du 2^{ème} âge ayant achevé leur première mue. On examine la présence du pathogène inoculé sur les larves mortes pour déterminer sa pathogénicité d'après les postulats de Koch. On teste la pathogénicité des microbes pathogènes envers *D. pulverulentalis*, confirmée d'après les postulats de Koch, chez le ver à soie. On procède à l'inoculation du pathogène chez le ver à soie en deux lots, l'un chez les larves qui viennent d'éclore et l'autre immédiatement après la 1^{ère} mue. On maintient trois répétitions de 50 larves chacune pour chaque pathogène.

Evaluation de l'infectiosité des pathogènes du ver à soie chez *D. pulverulentalis* :

On teste la pathogénicité des pathogènes isolés chez le ver à soie *Bombyx mori* L., c'est à dire *Nosema bombycis* (microsporides), *B. bassiana* (champignon) et BmNPV (virus) chez l'enrouleur de la feuille *D. pulverulentalis*. On prépare la suspension du pathogène dans de l'eau distillée et on la dilue pour obtenir un inoculum de 1×10^7 unités / ml. Pour *B. bassiana*, on applique l'inoculum de manière topique sur les larves de *D. pulverulentalis* tandis que les spores de *Nosema bombycis* et les corps polyédraux nucléaires sont inoculés *per os* en déposant l'inoculum sur une feuille de mûrier à raison de 1 ml / 100 cm² de feuille de mûrier tendre. On procède à l'inoculation chez les trois âges de l'enrouleur de la feuille, c'est à dire immédiatement après l'éclosion, après la 1^{ère} mue et après la 2^{ème} mue. Les larves sont élevées jusqu'à la nymphose à $26 \pm 1^\circ \text{C}$ et avec 70 à 80 % d'HR. On enregistre la mortalité due à l'infestation par le pathogène spécifique.

RESULTATS

Les résultats de l'étude sont présentés dans les Tableaux I à III. On observe que 85 des 1000 larves de *D. pulverulentalis* sont infestées par des microbes. Les microbes isolés sont identifiés comme le virus de la polyédrose nucléaire, *Beauveria bassiana*, les microsporidies (3 types), et les bactéries *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus* sp. Les résultats de l'évaluation de la population sauvage de *D. pulverulentalis* par rapport à la présence de pathogènes variés sont présentés dans le Tableau I. Les données montrent que 43,23 % des échantillons larvaires morts / malades s'avèrent être infestés par *B. bassiana* (Fig. 1 – b & c), 29,41 % des larves mortes / malades sont infestées par des microsporidies (Fig. 2 – a & b), tandis que les corps polyédraux nucléaires (Fig. 3) sont présents dans 10,58 % des échantillons larvaires testés. On trouve que des espèces diverses de bactéries infestent 11,76 % des échantillons et aucun des échantillons larvaires ne révèle la présence d'IFV ou de DNV.

Les résultats sur l'infectiosité croisée des microbes pathogènes de *D. pulverulentalis* chez le ver à soie *Bombyx mori* L. sont présentés dans le Tableau II. L'étude montre la présence de 3 types de spores microsporidiennes (Microspores-1 : $3,86 \times 2,57 \mu\text{m}$; microspores-2 : $5,14 \times 1,67 \mu\text{m}$ et microspores-3 : $2,83 \times 1,24 \mu\text{m}$). Les microsporidies-1 sont morphologiquement similaires à *N. bombycis* du ver à soie (Fig. 2 – a, b & c) et entraînent une infestation. Cependant, les autres microsporidies 2 & 3 ne se multiplient pas chez le ver à soie. Les microsporidies pathogènes entraînent une infestation chez le ver à soie d'environ 80 % chez les larves du premier âge et de 66 % chez les larves du 2^{ème} âge. Les conidies de *B. bassiana* isolées sur *D. pulverulentalis* entraînent 100 % de mortalité chez les larves du 1^{er} et du 2^{ème} âge. Les bactéries de *Streptococcus* et de *Bacillus* sp. isolées sur *D. pulverulentalis* donnent 28 et 16 % de mortalité chez les larves du premier âge et de 16 et 12 % respectivement au deuxième âge. Cependant, les bactéries *Staphylococcus* et *Micrococcus* sp. n'entraînent aucune mortalité chez les larves du ver à soie.

Les résultats sur l'évaluation des pathogènes du ver à soie chez *D. pulverulentalis* sont présentés dans le Tableau III. On observe que BmNPV n'entraîne pas d'infestation chez *D. pulverulentalis* tandis que *N. bombycis* et *B. bassiana* sont très pathogènes envers *D. pulverulentalis*. *N. bombycis* entraîne une infestation de 60 à 80 % chez les larves de *D. pulverulentalis* du 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} âges. *B. bassiana* entraîne 100 % de mortalité à cause de la muscardine à tous les stades chez *D. pulverulentalis*.

DISCUSSION

Les observations de cette étude indiquent clairement que *D. pulverulentalis* héberge des microbes qui sont pathogènes chez le ver à soie. Parmi eux, l'un est une microsporidie morphologiquement similaire à *N. bombycis*. Geetha Bai et coll., (1999) ont rapporté que *D. pulverulentalis* est sensible à *Nosema bombycis* Nageli, l'agent responsable de la maladie de la pébrine chez le ver à soie dans des conditions de laboratoire. Les observations de cette étude confirment donc les résultats rapportés précédemment. Les observations de cette étude selon lesquelles les échantillons malades de la population sauvage de *D. pulverulentalis* sont infestés par des microsporidies suggèrent que le parasite est une source potentielle de contaminations secondaires pathogènes chez le ver à soie *Bombyx mori* L. qui à leur tour peuvent transmettre des maladies par la feuille de mûrier. Un certain nombre d'auteurs ont rapporté l'infectiosité croisée de *Nosema bombycis* du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* chez des lépidoptères et d'autres insectes parasites. On sait que *Nosema bombycis* infeste plusieurs insectes d'ordres différents comme les Diptères (45 espèces), les Lépidoptères (25 espèces), les éphéméroptères (3 espèces) et les hyménoptères (6 espèces) etc.. (Steinhaus, 1949). Nous avons étudié l'infectiosité croisée de *Nosema bombycis* sur différents insectes parasites comme le papillon du navet (*Agrotis segetum* Schiff), l'agrotide des moissons (*A. exclamatio* L.), le papillon du coton noctuidé (*Heliothis armigera*), la chenille de la leucanie (*Spodoptera exigua* Hb), la teigne des crucifères (*P.*

brassicae). Chez toutes les espèces ci-dessus, les larves infestées meurent avant l'âge adulte sauf chez *H. armigera* (Kashkarova, 1981). Une microsporidie isolée sur la piéride du chou *Pieris rapae*, est pathogène chez le ver à soie et le taux d'infestation est de 20 à 51,3 % (Zheng et coll., 1996). Ce rapport sur l'infestation du ver à soie par une microsporidie du parasite du mûrier *D. pulverulentalis* est très significatif puisque le parasite infeste massivement de vastes zones séricicoles en Inde. La pébrine provoquée par *Nosema bombycis* est l'une des maladies les plus dangereuses du ver à soie et elle a décimé l'industrie séricicole de plusieurs pays européens par le passé.

En dehors des microsporidies, les champignons *B. bassiana* de la muscardine blanche du ver à soie ont été isolés sur la population sauvage de *D. pulverulentalis*. Cette observation est importante compte tenu du taux alarmant de diffusion de la maladie et de l'infectiosité croisée du pathogène de *Bombyx mori* à *D. pulverulentalis* et inversement. Cela pourrait être une des raisons de l'incidence élevée de la muscardine blanche chez le ver à soie pendant les saisons des pluies et de l'hiver puisque l'on relève une infestation élevée de *D. pulverulentalis* chez le mûrier pendant ces saisons.

Contrairement à l'infectiosité croisée de *Nosema bombycis* envers *Diaphania pulverulentalis*, l'autre pathogène testé c'est à dire BmNPV ne s'avère pas provoquer d'infestation croisée chez *D. pulverulentalis*, ce qui montre que les virus présentent une spécificité considérable par rapport à leur hôte. Cependant, certains échantillons malades recueillis sur la population sauvage de *Diaphania pulverulentalis* révèlent la présence de corps polyédraux nucléaires. Les virus de la polyédrose nucléaire sont en général spécifiques de l'hôte et en tant que tels il se pourrait que les autres espèces n'infestent pas le ver à soie *Bombyx mori* L. Il existe donc des possibilités d'utilisation du NPV isolé sur *D. pulverulentalis* comme agent de lutte biologique potentiel contre ce parasite, qui pourraient être exploitées.

STUDIES ON BIVOLTINE COCOON COOKING – PART I : EFFECT OF RETTING TEMPERATURE AND PERMEATION TREATMENT CONDITION ON REELING PERFORMANCE OF INDIAN BIVOLTINE HYBRID COCOONS

SUBHAS. V. NAIK & T.H. SOMASHEKAR*

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, B.T.M Layout, Madiwala,
Bangalore – 560068, India.

The influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment of cocoon cooking on reeling characteristics has been studied using CSR race bivoltine hybrid cocoons. It is observed that both retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment have a significant influence on reelability, non broken filament length, raw silk recovery, waste %, and raw silk %. From the results it is also observed that retting temperature plays a dominant role on raw silk recovery, raw silk % and waste %, whereas difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment plays a vital role on reelability. Further the results indicate that amount of water absorption in retting and low temperature water (permeation) treatment is found to have significant influence on the cocoon cooking condition, which in turn influences the reeling characteristics.

Keywords: Retting treatment, Low temperature water (permeation) treatment, Reelability, Raw silk %, waste %.

INTRODUCTION

In cocoon cooking water is made to penetrate from outside to inside, inside to outside and then from outside to inside of the cocoon and cocoon shell in a sequence in order to swell and soften the sericin of a cocoon filament layers of the shell to the required level using 6 different treatments (Takashi Omura 1981). Duration and temperatures of these treatments depend on cocoon quality and sericin characteristics of the cocoons. Hence selection of proper temperature and duration of these cooking treatments is one of the important process control techniques in silk reeling for achieving better results. Retting treatment and low temperature water (permeation) treatment are two important treatments of these 6 treatments of cocoon cooking. Studies have been conducted in Japan with respect to influence of pre treatment of cocoon cooking on reeling and quality characteristics of the raw silk depending on origin of cocoon races (Shimazaki *et. al.*, 1961, 1962, Koike *et. al.* 1953). Studies have also been conducted on influence of cocoon cooking on reeling characteristics (Kinoshita *et. al.* 1979, 1980). In India, Central Sericultural Research and Training Institute at Mysore, India has developed recently elite bivoltine hybrid CSR race cocoons, in association with JICA of Japan (Basavaraju *et al.* 1995). These CSR race bivoltine hybrid cocoons have number of promising features such as higher

* Author to whom correspondence may be addressed.

shell content, longer filament length, good compactness, reelability and filament having higher neatness points and hence they are suitable for production of superior grade raw silk.

The Central Silk Technological Research Institute (CSTRI), at Bangalore, India, has developed Batch type Pressurised circular cocoon cooking machine to cook the cocoons effectively (Subhas. *et.al.* 2000). Standardisation of cocoon cooking parameters for CSR race bivoltine cocoons using this batch type circular cocoon cooking machine is essential for Indian silk reeling industry for production of superior grade raw silk. Information available in this regard is scanty and no published literature is available for Indian cocoons. Therefore studies have been conducted in pressurized circular cooking machine to investigate the influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment of cocoon cooking on reeling characteristics of CSR race hybrid cocoons.

MATERIALS AND METHODS

1) Raw material:

Bivoltine hybrid cocoons of CSR2 × CSR4 race were used for the study.

2) Drying conditions:

The cocoons were dried in a batch type hot air drier following a temperature profile of 115°C to 50°C for a period of five hours, achieving around 42.67 % degree of drying.

3) Cocoon cooking:

Cocoon cooking was carried out using CSTRI batch type pressurised circular cocoon cooking machine. The temperature and duration used as per the design of experiment is as follows;

a) Retting conditions (A):		A1	A2	A3
Temperature		60° C	70° C	80 °C
Duration		1.5 min	1.5 min	1.5 min
b) High temperature (steam) treatment:				
Temperature:		90 °C		
Durat:		1.5min		
c) Low temperature water (perneation):				
Temperature :		75 °C	80°C	85°C
Duration:		1.75mi	1.75 min	1.75 min
Difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment.		B1	B2	B3
		15°C	10°C	5°C
d) Steam cooking :				
Temperature :		97°C		
Duration :		1 min		
e) Adjustment temperature :				
Initial temperature:		96°C		
Duration :		1min		

Then water temperature was reduced gradually from 96°C to 70°C in 5 minutes by sprinkling water.

(Note: In all the cases after low temperature water (permeation) treatment, cocoons were kept above the water level in cooking machine at 75°C and water temperature is raised to 96°C before cooking treatment for 4 minutes).

4. Brushing: Cooked cocoons were brushed at 80°C hot water.

5. Reeling conditions:

The cocoons were reeled on CSTRI Multiend reeling machine with following parameters:

Reeling speed :	100 mtrs/ min
Croissure length :	8cms
Basin water temperature	40°C

6. Water Quality :

Water having standard characteristics for reeling i. e. 7.1 pH, 70 ppm hardness and 80 ppm Alkalinity was used for the study.

Reeling characteristics i.e. Reelability, Avg. filament length, Non broken filament length, Waste % on silk weight, Raw silk % were calculated from the reeling results obtained during reeling of different combinations as per the design of experiment.

7. Cocoon cooking degree:

In order to understand the influence of the retting temperature and low temperature water (permeation) treatment on the cooking conditions, the water content in the cooked cocoon and cocoon shell were measured in each cooking condition using the following formulae,

$$\text{Absorption of water in the cocoon (cocoon cooking degree)} = \frac{\text{Cooked cocoon weight}}{\text{Dry cocoon weight}}$$

$$\text{Water content in cocoon shell (\%)} = \frac{\text{Cooked shell weight} - \text{dry shell weight}}{\text{Dry shell weight}} \times 100$$

8. Data analysis:

The data collected were statistically analysed.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Reelability and Non-broken filament length:

Average results of influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on reeling performance are given in Table I. The results of the analysis of variance and contribution ratio analysis are given in Table - II & III.

From Table I and figures 1 & 2 it is observed that 70°C and 80°C retting temperatures with 15°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment have resulted in significantly better Reelability and non-broken filament length as compared to other combinations. Further, from the results (Table I and figures 1&2) it can be observed that as the difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment increases reelability and non-broken filament length are found to increase significantly. From Table II it can be seen that influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on reelability and non-broken filament length is significant at 1% level. From Table II it can also be observed that interaction effect of retting temperature and difference in

temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on reelability and non-broken filament length is statistically significant at 1% level.

From the figures 1 & 2 it can also be seen that 60°C retting temperature and 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment have affected reelability and non-broken filament length quite significantly. From the CD values (Table I) it is observed that differences in reelability and non-broken filament length between 5°C, 10°C and 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatments are significant at 1% level. From the contribution ratio analysis (Table III) it can be observed that contribution of difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on reelability and non-broken filament length is more than that of retting temperature.

Table I. Influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature steam treatment and low temperature water treatment on reeling characteristics (mean values).

Tableau I. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée et le traitement à l'eau à basse température sur les caractéristiques de dévidage (valeurs moyennes).

Cooking * parameters	Reelability (%)	Avg. filament length (mtrs)	Non broken filament length (mtrs)	Raw silk (%)	Raw silk recovery (%)	Waste % on silk weight
<i>Paramètres de cuisson*</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Longueur moyenne du filament (m)</i>	<i>Longueur du filament sans rupture (m)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>% de récupération de soie grège</i>	<i>% de déchets par rapport au poids de la soie</i>
A1B1	83.10	1050	873	17.68	75.37	8.11
A1B2	80.25	1039	834	17.60	75.00	8.76
A1B3	71.85	1030	740	17.34	73.92	9.70
A2B1	85.30	1034	882	17.36	73.98	9.64
A2B2	84.00	1027	863	17.04	72.62	10.59
A2B3	80.40	1020	821	16.50	70.30	11.93
A3B1	92.00	1017	935	17.21	73.34	10.16
A3B2	83.70	1010	846	16.87	72.27	11.99
A3B3	79.60	1005	800	16.85	71.83	12.18
CD (P ≤ 0.05) for						
A	1.1	6	14	0.07	0.30	0.86
B	1.1	6	14	0.07	0.30	0.86
A x B	1.9	10	24	0.11	5.24	1.48

* A- Retting temperature / Température de rouissage : A1= 60°C, A2= 70°C & A3= 80°C

B- Différence in temperature between high temperature treatment (90°C constant) and low temperature treatment / Différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90°C) et le traitement à faible température. B1=15°C, B2= 10°C & B3 =5°C

It is to be noted that as per the cocoon cooking theory the temperature difference between the high temperature steam treatment and low temperature water (permeation) treatment, and pressure difference between inside the cocoon and outside the cocoon in low temperature water treatment zone influences the quantity of water absorption by the cocoon and cocoon shell. If these differences are more water absorption is more, where as if these differences are less, water absorption by cocoon and cocoon shell is less. Water absorption in cocoon can be theoretically calculated by using air pressure (P) volume (V) and thermal temperature (T).

The pressure, volume and temperature of air inside the cocoon cavity are say, P_1 , V_1 , & T_1 respectively at the time of high steam temperature treatment and the pressure, volume and temperature of air inside the cocoon cavity after low temperature water (permeation) treatment are P_2 , V_2 , & T_2 respectively, then,

$$\frac{P_1 V_1}{T_1} = \frac{P_2 V_2}{T_2} \text{ --- (1)}$$

The volume of air inside cocoon cavity after the transfer of cocoon from high temperature T_1 to T_2 is

$$V_2 = V_1 \times \frac{P_1 T_2}{P_2 T_1} \text{ --- (2)}$$

Then the theoretical water absorption rate N (%) of cocoon cavity is:

$$N(\%) = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \times 100 = \left(1 - \frac{V_2}{V_1}\right) \times 100$$

Substituting for V_2 (from equation 2)

$$N(\%) = \left(1 - \frac{P_1 T_2}{P_2 T_1}\right) \times 100$$

Due to reduction of V_2 and hence creation of vacuum inside the cocoon cavity due to the treatment of high temperature steam treatment, water will easily enter inside the cocoon cavity in low temperature water (permeation) treatment zone. In the present study, difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment are 15°C , 10°C and 5°C when the temperatures in the low temperature water treatment zone are 75°C , 80°C and 85°C respectively.

Therefore, 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment has resulted in under cooking of cocoons (particularly in the inside layers of cocoon shell). It is due to the fact that, after pretreatment (for water permeation) cocoons will be subjected to boiling temperature of 97°C ~ 98°C . During this boiling stage, if the required water is present inside the cocoon and cocoon shell, all the layers of cocoon shell together will be subjected to boiling temperature of 97°C leading to uniform swelling and softening of sericin of the filament layers of cocoon shell layers. Whereas if water absorption in cocoon shell in pre treatment is less, inside layers and middle layers will not be cooked properly resulting in under / uneven cooking. This is the reason why reelability and non-broken filament length decreases as the difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment decreases.

Table II. Analysis of variance of reeling performance results.

Tableau II. Analyse de variance pour les résultats de dévidage.

Mean sum of squares / Somme moyenne des carrés							
Factors	Degree of freedom	Reelability	Avg. filament length	Nonbroken filament length	Raw silk percentage	Raw silk recovery	Waste % on silk weight
<i>Facteurs</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Dévidabilité</i>	<i>Longueur moyenne du filament</i>	<i>Longueur du filament sans rupture</i>	<i>% de soie grège</i>	<i>Récupération de soie grège</i>	<i>% de déchets par rapport au poids de la soie</i>
A	2	71.736**	1283.389**	3605.167**	0.648**	11.305**	10.671**
B	2	136.591**	352.889**	1822**	0.401**	7.410**	5.834**
A x B	4	12.266**	10.472 ^{NS}	1311.917**	0.05735**	0.927**	0.280 ^{NS}
Replication <i>Répétition</i>	1	1.620 ^{NS}	6272.000**	2762.722**	0.387**	6.067**	1.066 ^{NS}
Error / <i>Erreur</i>	8	0.681	18.250	109.222	0.00245	0.052	0.414

A - Retting temperature / *Température de rouissage* : A1 = 60°C, A2 = 70°C & A3 = 80°C.B-Difference in temperature between high temperature treatment (90°C constant) and low temperature treatment / *Différence de température entre le traitement à température élevée et le traitement à faible température* B1 = 15°C, B2 = 10°C & B3 = 5°C.**Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %*, * Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %*,^{NS} Non significant / *Non significatif*.

With reference to the above explanation from the figures 3 & 4 it can be observed that as the difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment decreases, cooking degree and water absorption by cocoon shell decreases significantly. From the figure it can be observed that water content in cocoon shell increases from 473.8% to 536.1% as difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water treatment increases from 5°C to 15°C.

Average filament length:

From Table I and figure 5 it can be seen that 60°C retting temperature and 15°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment combination have given better filament length as compared to other combinations. Further, from the figure 5 it can be seen that as the retting temperature increases from 60°C to 80°C and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment decreases from 15°C to 5°C, average filament length is found to decrease significantly. From Table II it can be observed that influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on average filament length is statistically significant at 1% level.

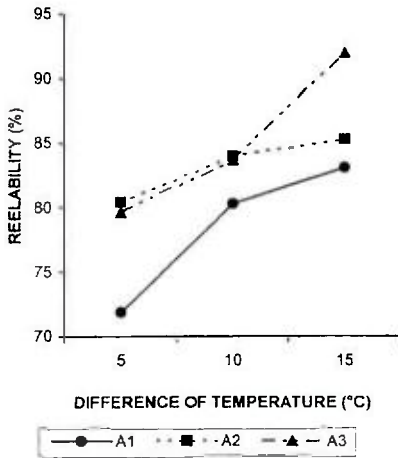


Fig. 1. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on reelability of cocoons.

Fig. 1. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à basse température sur la dévidabilité des cocons.

A1- 60° C retting temp. / Temp. de rouissage 60° C.
A2- 70° C retting temp. / Temp. de rouissage 70° C.
A3- 80° C retting temperature / Temp. de rouissage 80° C.

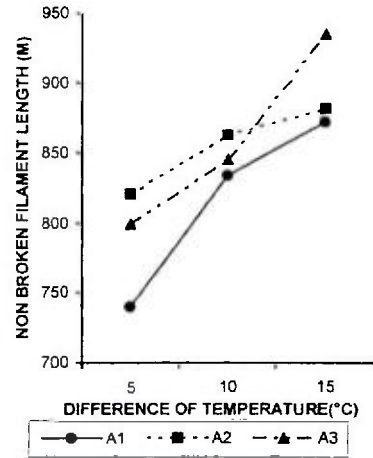


Fig. 2. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on non broken filament length of cocoons.

Fig. 2. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à faible température sur la longueur du filament sans rupture des cocons.

A1- 60° C retting temp. / Temp. de rouissage 60° C.
A2- 70° C retting temp. / Temp. de rouissage 70° C.
A3- 80° C retting temperature / Temp. de rouissage 80° C.

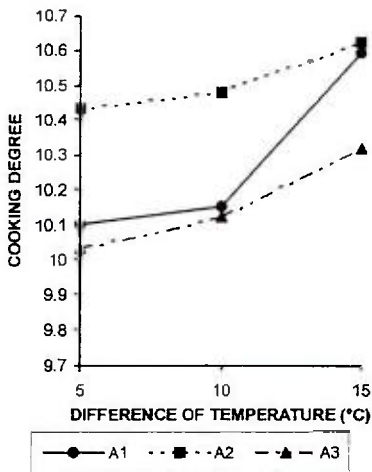


Fig. 3. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on cocoon cooking degree.

Fig. 3. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à faible température sur le degré de cuisson du cocon.

A1- 60° C retting temp. / Temp. de rouissage 60° C.
A2- 70° C retting temp. / Temp. de rouissage 70° C.
A3- 80° C retting temperature / Temp. de rouissage 80° C.

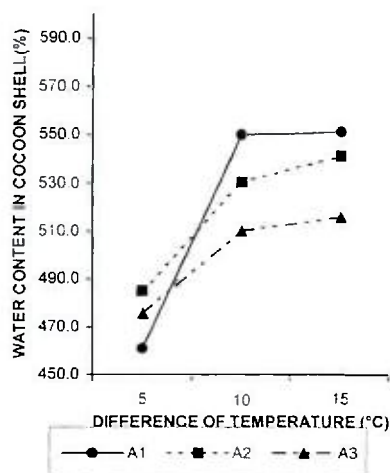


Fig. 4. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C constant) treatment and low temperature water treatment on water content in cocoon shell.

Fig. 4. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à faible température sur la teneur en eau de la coque soyeuse.

A1- 60° C retting temp. / Temp. de rouissage 60° C.
A2- 70° C retting temp. / Temp. de rouissage 70° C.
A3- 80° C retting temperature / Temp. de rouissage 80° C.

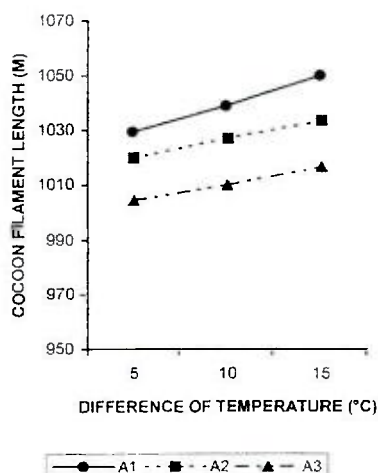


Fig. 5. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on cocoon filament length.

Fig. 5. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à faible température sur la longueur du filament du cocon.

A1- 60° C retting temp. / Temp. de rouissage 60° C.
A2- 70° C retting temp. / Temp. de rouissage 70° C.
A3- 80° C retting temperature / Temp. de rouissage 80° C.

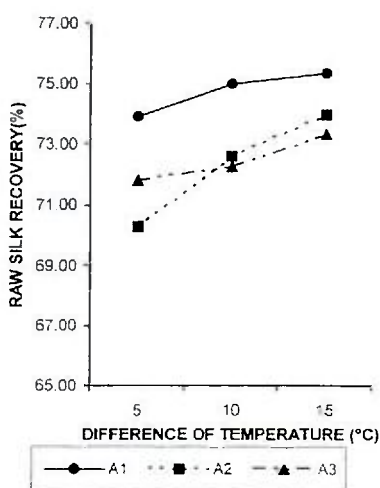


Fig. 6. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C constant) treatment and low temperature water treatment on raw silk recovery.

Fig. 6. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à faible température sur la récupération de soie grège.

A1- 60° C retting temp. / Temp. de rouissage 60° C.
A2- 70° C retting temp. / Temp. de rouissage 70° C.
A3- 80° C retting temperature / Temp. de rouissage 80° C.

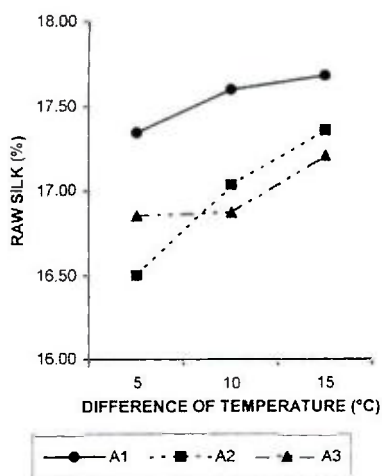


Fig. 7. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C constant) treatment and low temperature water treatment on raw silk (%).

Fig. 7. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à la vapeur (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à faible température sur le % de soie grège.

A1 - 60° C retting temp. / Temp. de rouissage 60° C.

A2 - 70° C retting temp. / Temp. de rouissage 70° C.

A3 - 80° C retting temperature / Temp. de rouissage 80° C.

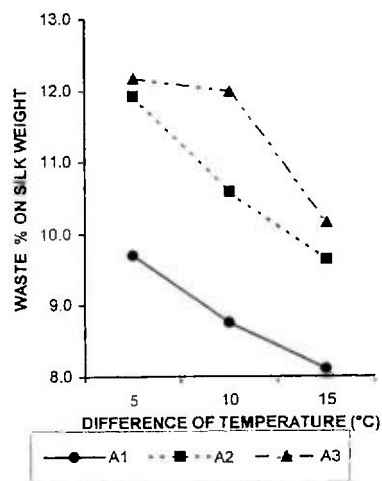


Fig. 8. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C constant) treatment and low temperature water treatment on waste % on silk weight.

Fig. 8. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à faible température sur le % de déchets par rapport au poids de la soie.

A1 - 60° C retting temp. / Temp. de rouissage 60° C.

A2 - 70° C retting temp. / Temp. de rouissage 70° C.

A3 - 80° C retting temperature / Temp. de rouissage 80° C.

From the CD values (Table I) it is observed that difference in average filament length between retting temperatures of 60°C, 70°C & 80°C and that between 15°C, 10°C & 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment are significant.

Decrease in filament length at higher retting temperature of 80°C can be attributed to over softening of outside layers of the cocoons. Further significant reduction in reelability at lower difference in temperature (5°C) between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment has resulted in higher waste % (fig.6) leading to reduced filament length.

Raw silk recovery, raw silk % and waste % :

From Table I and figures 6, 7 & 8 it is observed that as the retting temperature increases, raw silk recovery and hence raw silk % decreases significantly, where as waste % increases. From the table II it can be observed that influence of retting temperature on raw silk recovery, raw silk % and waste % on silk weight is statistically significant at 1 % level. Increase in waste % and hence decrease in raw silk recovery and hence raw silk% at higher retting temperature of 80°C can be attributed to over softening of outside layers of the cocoons.

Further, from Table I and figures 6, 7 & 8 it can be observed that as the difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment increases, raw silk recovery and hence raw silk % were found to increase, whereas waste % on silk

weight was found to decrease significantly. From Table II it is observed that influence of difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on raw silk %, raw silk recovery % and waste % on silk weight is statistically significant at 1% level. Further, it can be observed that interaction effect of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on raw silk recovery and raw silk % is statistically significant at 1% level.

Table III. Contribution ratio (%) analysis of cocoon cooking parameters on reeling characteristics.

Tableau III. Analyse du taux de contribution (%) des paramètres de cuisson du cocon par rapport aux caractéristiques de dévidage.

Contribution ratio (%) of cooking parameters						
Cooking parameters	Reelability	Non-broken filament length	Average filament length	Raw silk recovery	Raw silk %	Waste % on silk weight
<i>Taux de contribution (%) des paramètres de cuisson</i>						
<i>Paramètres de cuisson</i>	<i>Dévidabilité</i>	<i>Longueur du filament sans rupture</i>	<i>Longueur moyenne du filament</i>	<i>Récupération de soie grège</i>	<i>% de soie grège</i>	<i>% de déchets par rapport au poids de la soie</i>
A	30.06	13.31	26	47.27	47.22	53.27
B	57.49	68.95	6.91	30.91	29.12	28.15

A- Retting temperature / *Température de rouissage* : A1=60°C, A2= 70°C & A3= 80°C.

B- Difference in temperature between high temperature treatment (90°C constant) and low temperature treatment / *Différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90°C) et le traitement à faible température* B1=15°C, B2= 10°C & B3 =5°C.

Significant reduction in reelability at lower difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment has resulted in higher waste % (fig.6) leading to reduced raw silk recovery and raw silk %. This is due to under / uneven cooking of cocoons at lower difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment. From the CD values (Table I) it is observed that difference between raw silk recovery, raw silk % and waste % on silk weight of 60°C & 70°C retting temperatures and difference of these characteristics between 60°C & 80°C retting temperatures are significant; whereas differences in these characteristics between 70°C & 80°C retting temperature are insignificant.

Further from the CD (Table I) values it can be observed that differences between raw silk % of 15°C, 10°C and 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low

temperature water (permeation) treatment are statistically significant. From the contribution ratio analysis (Table III) it can be observed that contribution of retting temperature is more on raw silk recovery, raw silk % and waste % as compared to contribution of difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment.

CONCLUSION

From the above results and analysis it may be concluded that the amount of water absorption in pretreatment of cocoon cooking plays a significant role on the cocoon cooking conditions which in turn influences the reeling performance of cocoons. Retting temperature plays a dominant role on average filament length, raw silk recovery, raw silk % and waste %, where as difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment plays a vital role on reelability and non-broken filament length of cocoons. From the results it can also be inferred that in case of Pressurised circular cooking machine, 70°C ~ 75°C retting temperature and 10~15°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment with 75°C ~ 80°C temperature in the low temperature water (permeation) treatment (with required duration depending on cocoon quality) give better reeling performance from CSR hybrid bivoltine cocoons.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the technical staff of reeling division of CSTRI, Bangalore for their active support.

REFERENCES

- BASAVARAJU H.K., NIRMAL KUMAR S., & DATTA R.K., "New productive bivoltine hybrids" Indian Silk, June 1995 P 5-9.
- KINOSHITA.H, SUGANUMA.Y. (1979) Studies on the systematization of cocoon cooking I. On the analysis of the reeling characteristics by multivariate analysis. J.Seric.Sci. Jpn, 48, 404-410.
- KINOSHITA. H, SUGANUMA.Y, WATASE.H. (1980) Studies on the systematization of cocoon cooking II. On the optimization of cocoon cooking by temperature patterns. J.Seric.Sci. Jpn, 49, 352-358
- KOIKE. R, MARUYAMU Z. (1953) Relationship between sericin softening and volume of cocoons. J. Silk Sci. Tech. Japan, 3, 89-94.
- SHIMAZAKI. A., SEKIJIMA. M. (1961) Studies on pretreatment of cocoon cooking. Part I. J. Silk Sci. Tech. Japan, 11, 1-8.
- SHIMAZAKI A. YAMAMOTO A. (1962) Studies on pretreatment of cocoon cooking. Part-II J. Silk. Sci. Tech. Japan, 12, 4-7.
- SUBHAS.V.NAIK, HARIRAJ.G MAHESH.K.N., B.N.LAKSHMIPATHAIAH & SOMASHEKAR.T.H.(2000) "Bivoltine silk reeling technology package for reeling international grade raw silk from CSR hybrid bivoltine cocoons" Paper presented during National conference on "Strategies for Sericulture Research & Development in the new millennium" held at CSR&TI, Mysore, India, from 16th to 18th November 2000.
- TAKASHI OMURA (1981) "Silk reeling techniques in the tropics" book published by Japan International Co-operation Agency, Tokyo, Japan, 125- 128.

ETUDES SUR LA CUISSON DES COCONS BIVOLTINS - PREMIERE PARTIE : EFFET DE LA TEMPERATURE DE ROUISSAGE ET DES CONDITIONS DU TRAITEMENT D'IMPREGNATION SUR LE DEVIDAGE DE COCONS HYBRIDES BIVOLTINS INDIENS

SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR*

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, B.T.M. Layout, Madiwala,
Bangalore — 560068, Inde.

Nous avons étudié l'influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) pendant la cuisson des cocons sur les caractéristiques de dévidage en utilisant des cocons hybrides bivoltins CSR. Nous avons observé que la température de rouissage tout comme la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) ont une influence significative sur la dévidabilité, la longueur du filament sans rupture, la récupération de soie grège, le % de déchets, et le % de soie grège. D'après les résultats, nous observons aussi que la température de rouissage joue un rôle primordial par rapport à la récupération de soie grège, au % de soie grège et au % de déchets, tandis que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) joue un rôle vital sur la dévidabilité. De plus, les résultats indiquent que la quantité d'eau absorbée avec le traitement de rouissage et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) s'avère avoir une influence significative sur les conditions de cuisson des cocons, qui à leur tour influencent les caractéristiques de dévidage.

INTRODUCTION

Pendant la cuisson des cocons, on fait pénétrer l'eau de l'extérieur à l'intérieur, de l'intérieur à l'extérieur et puis de l'extérieur à l'intérieur du cocon et de la coque soyeuse dans cet ordre de manière à gonfler et à amollir la sérécine des couches de la coque soyeuse au niveau requis en utilisant 6 traitements différents (Takashi Omura, 1981). La durée et les températures de ces traitements dépendent de la qualité du cocon et des caractéristiques de la sérécine des cocons. Ainsi une des techniques importantes de contrôle du processus du dévidage de la soie est la sélection d'une température et d'une durée correctes pour les traitements de cuisson afin d'obtenir les meilleurs résultats. Le traitement de rouissage et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sont deux traitements importants parmi ces 6 traitements de cuisson du cocon. Des études ont été réalisées au Japon sur l'influence du pré-traitement de cuisson des cocons sur les caractéristiques de dévidage et de qualité de la soie grège par rapport à l'origine des races de cocons (Shimazaki et coll., 1961, 1962, Koike et coll., 1953). Des études ont aussi été réalisées sur l'influence de la cuisson des cocons sur les caractéristiques de dévidage (Kinoshita et coll., 1953). En Inde, le *Central Sericultural Research and Training Institute* à Mysore a récemment mis au point en association avec la JICA au

* Auteur auquel adresser la correspondance.

Japon des cocons de la race CSR bivoltins hybrides (Basavaraju et coll., 1995). Ces cocons hybrides bivoltins de la race CSR ont un certain nombre de traits prometteurs tels qu'une valeur plus élevée de coque, un filament plus long, de bonnes densité et dévidabilité et un filament ayant plus de netteté ; ils sont donc adaptés à la production de soie grège de qualité supérieure.

Le *Central Silk Technological Research Institute* (CSRTI) à Bangalore, en Inde a mis au point une machine circulaire pressurisée de cuisson en série des cocons pour cuire les cocons efficacement (Subhas et coll., 2000). La standardisation des paramètres de cuisson en série des cocons pour les cocons bivoltins de la race CSR en utilisant une machine circulaire de cuisson des cocons est essentielle pour l'industrie indienne du dévidage de la soie pour produire de la soie grège de qualité supérieure. L'information disponible à ce sujet est rare et aucune littérature n'a été publiée sur les cocons indiens. Des études ont donc été réalisées avec une machine de cuisson circulaire pressurisée pour étudier l'influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) au cours de la cuisson des cocons sur les caractéristiques de dévidage des cocons hybrides de la race CSR.

MATERIELS ET METHODES

1) Matières premières :

Des cocons bivoltins hybrides de la race CSR2×CSR4 sont utilisés pour l'étude.

2) Conditions de séchage :

On sèche les cocons dans un séchoir en série en suivant un programme de températures de 115° C à 50° C pendant une période de cinq heures en atteignant un degré de séchage de 42,67 %.

3) Cuisson des cocons :

On procède à la cuisson des cocons en utilisant une machine circulaire pressurisée de cuisson en série des cocons. La température et la durée utilisées au cours de l'expérience sont les suivantes :

a) Conditions de cuisson (A) :

	A1	A2	A3
Température	60° C	70° C	80° C
Durée	1,5 min	1,5 min	1,5 min

b) Traitement à température élevée (vapeur) :

Température	90° C
Durée	1,5 minutes

c) Eau à basse température (imprégnation) :

Température :	75° C	80° C	85° C
Durée	1,75 minn	1,75 min	1,75 min

Différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température

B1	B2	B3
15° C	10° C	5° C

d) Cuisson à la vapeur : Température Durée

97° C
1 min

e) Température d'ajustement :

Température initiale	96° C
----------------------	-------

Durée

1 min

Puis on diminue progressivement la température de l'eau de 96° C à 70° C en 5 minutes en aspergeant de l'eau.

(Note : Dans tous les cas après le traitement à l'eau à basse température (imprégnation), les cocons sont conservés au-dessus du niveau de l'eau dans une machine de cuisson à 75° C et on élève la température de l'eau à 96° C avant le traitement de cuisson pendant 4 minutes).

4. Purgeage :

Les cocons cuits sont purgés dans une eau chaude à 80° C.

5. Conditions de dévidage :

Les cocons sont dévidés sur une machine de dévidage multibouts du CSRTI ayant les paramètres suivants :

Vitesse de dévidage :	100 m / min.
Longueur de croisure :	8 cm
Température de l'eau de la bassine	40° C

6. Qualité de l'eau :

On utilise une eau avec les caractéristiques habituelles pour le dévidage, c'est à dire un pH de 7,1, une dureté de 70 ppm et une alcalinité de 80 ppm.

Les caractéristiques de dévidage c'est à dire la dévidabilité, la longueur moyenne du filament, la longueur du filament sans rupture, le % de déchets par rapport au poids de la soie et le % de soie grège sont calculées d'après les résultats obtenus au cours du dévidage avec différentes combinaisons en fonction de la conception de l'expérience.

7. Degré de cuisson des cocons :

Pour comprendre l'influence de la température de rouissage et du traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur les conditions de cuisson, on mesure la teneur en eau des cocons cuits et de la coque soyeuse pour chaque condition de cuisson en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Absorption de l'eau dans le cocon (degré de cuisson du cocon)} = \frac{\text{Poids du cocon cuit}}{\text{Poids du cocon sec}}$$

$$\text{Teneur en eau de la coque soyeuse (\%)} =$$

$$\frac{\text{Poids de la coque cuite} - \text{Poids de la coque sèche}}{\text{Poids de la coque sèche}} \times 100$$

8. Analyse des données :

Les données recueillies sont analysées statistiquement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dévidabilité et longueur du filament sans rupture :

Les résultats moyens concernant l'influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur la performance de dévidage sont présentés dans le Tableau 1. Les

résultats pour l'analyse de variance et pour l'analyse du taux de contribution sont présentés dans les Tableaux II et III.

D'après le Tableau I et les figures 1 & 2, on observe que les températures de rouissage de 70° C et 80° C avec une différence de température de 15° C entre le traitement à température élevée (imprégnation) et le traitement à l'eau à basse température donnent une dévidabilité et une longueur du filament sans rupture bien meilleures par comparaison aux autres combinaisons. De plus, d'après les résultats (Tableau I et figures 1 & 2), on peut observer qu'alors que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) augmente, la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture augmentent de manière significative. D'après le Tableau II, on peut voir que l'influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture est significative au seuil de 1 %. D'après le Tableau II, on peut aussi observer que l'effet de l'interaction entre la température de rouissage et la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture est significatif sur le plan statistique au seuil de 1 %.

Les figures 1 & 2 permettent aussi de constater que le rouissage à une température de 60° C et qu'une différence de température de 5° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) affectent la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture de manière assez significative. D'après les valeurs CD (Tableau I), on observe que des différences de température de 15° C, 10° C et 5° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) donnent des différences significatives à un seuil de 1 % quant à la dévidabilité et à la longueur du filament sans rupture. L'analyse du ratio de contribution (Tableau III), permet de constater que la contribution de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) est plus importante que celle de la température de rouissage pour ce qui est de la dévidabilité et de la longueur du filament sans rupture.

Il faut noter que selon la théorie de cuisson des cocons, la différence de température entre le traitement à température élevée et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) et la différence de pression entre l'intérieur du cocon et l'extérieur du cocon lors du traitement à l'eau à basse température influence la quantité d'eau absorbée par le cocon et la coque soyeuse. Si ces différences sont plus importantes, l'absorption de l'eau est plus importante, tandis que si ces différences sont moins importantes, l'absorption d'eau par le cocon et par la coque soyeuse est moins importante. L'absorption de l'eau dans le cocon peut être calculée théoriquement en utilisant la pression de l'air (P), le volume (V) et la température de l'eau (T).

La pression, le volume et la température de l'air à l'intérieur de la cavité du cocon sont désignés respectivement P₁, V₁ et T₁ au moment du traitement à la vapeur à température élevée et la pression, le volume et la température de l'air à l'intérieur de la cavité du cocon après le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sont respectivement P₂, V₂ et T₂. Alors,

$$\frac{P_1 V_1}{T_1} = \frac{P_2 V_2}{T_2} \quad (1)$$

Le volume de l'air à l'intérieur de la cavité du cocon après le transfert du cocon de la température élevée T₁ à T₂ est

$$V_2 = V_1 \times \frac{P_1 T_2}{P_2 T_1} \quad (2)$$

Puis le taux d'absorption théorique de l'eau N (%) de la cavité du cocon est :

$$N(\%) = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \times 100 = \left(1 - \frac{V_2}{V_1}\right) \times 100$$

En substituant pour V2 (d'après l'équation 2).

$$N(\%) = \left(1 - \left(1 - \frac{P_1 T_2}{P_2 T_1}\right)\right) \times 100$$

En raison de la baisse de V2 et donc de la création d'un vide à l'intérieur du cocon grâce au traitement à la vapeur à température élevée, l'eau entre facilement à l'intérieur de la cavité du cocon dans la zone de traitement à l'eau à basse température (imprégnation). Dans cette étude, la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sont de 15° C, 10° C et 5° C quand les températures dans la zone de traitement à l'eau à basse température sont respectivement de 75° C, 80° C et 85° C.

Donc, une différence de 5° C entre le traitement à température (vapeur) élevée et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) entraîne un manque de cuisson des cocons (particulièrement des couches internes de la coque soyeuse). Cela est dû au fait, qu'après le pré-traitement (pour l'imprégnation de l'eau), les cocons sont soumis à une température d'ébullition de 97° C à 98° C. Pendant cette étape d'ébullition, si l'eau nécessaire est présente à l'intérieur du cocon et de la coque soyeuse, toutes les couches de la coque soyeuse seront soumises ensemble à une température d'ébullition de 97° C, ce qui entraîne un gonflement et un amollissement uniformes de la séricine des couches de la coque soyeuse. Tandis que si l'absorption de l'eau dans la coque soyeuse pendant le pré-traitement est inférieure, les couches internes et moyennes ne cuiront pas correctement ce qui entraîne un manque de cuisson ou une cuisson irrégulière. C'est la raison pour laquelle la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture baissent alors que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement de l'eau à basse température (imprégnation) diminue.

D'après les figures 3 & 4, on peut observer qu'alors que la différence de température pour la combinaison de traitement à température élevée (vapeur) et de traitement à l'eau à basse température (imprégnation) baisse, le degré de cuisson et l'absorption à l'eau par la coque soyeuse baissent de manière significative. D'après les figures, on peut observer que la teneur en eau dans la coque soyeuse augmente de 473,8 % à 536,1 % alors que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température augmente de 5° C à 15° C.

Longueur moyenne du filament :

D'après le Tableau I et la figure 5, on peut voir qu'une température de rouissage de 60° C et une différence de température de 15° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) donne une meilleur longueur de filament par comparaison aux autres combinaisons. De plus, d'après la figure 5, on peut voir que lorsque la température de rouissage augmente de 60° C à 80° C et que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) baisse de 15° C à 5° C, la longueur moyenne du filament baisse de manière significative. D'après le Tableau II, on peut observer que l'influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur la longueur moyenne du filament est significative sur le plan statistique à un seuil de 1 %.

D'après les valeurs CD (Tableau I) on observe que les différences de températures de rouissage (60° C, 70° C et 80° C) et des différences de température de 15° C, 10° C et 5° C entre le traitement

à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) donnent des longueurs moyennes du filament significativement différentes.

La diminution de la longueur du filament à une température de rouissage plus élevée de 80° C peut être attribuée au trop grand ramollissement des couches externes des cocons. De plus, la baisse significative de la dévidabilité avec une différence de température inférieure (5° C) entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) entraîne un % de déchets plus élevé (fig. 6) ce qui se traduit par une diminution de la longueur du filament.

Récupération de soie grège, % de soie grège et % de déchets :

D'après le Tableau I et les figures 6, 7 et 8, on observe qu'alors que la température de rouissage augmente, la récupération de soie grège et donc le % de soie grège baissent de manière significative tandis que le % de déchets augmente. Le Tableau II, permet d'observer que l'influence de la température de rouissage sur la récupération de soie grège, le % de soie grège et le % de déchets par rapport au poids de la soie est significative sur le plan statistique à un seuil de 1 %. L'augmentation du % de déchets et donc la baisse de récupération de soie grège et du % de soie grège avec une température de rouissage plus élevée de 80° C peut être attribuée à un trop grand ramollissement des couches externes des cocons.

De plus, d'après le Tableau I et les figures 6, 7 et 8, on peut observer qu'alors que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) augmente, la récupération de soie grège et donc le % de soie grège augmentent tandis que le % de déchets par rapport au poids de la soie baisse de manière significative. D'après le Tableau II, on observe que l'influence de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur le % de soie grège, le % de récupération de soie grège et le % de déchets par rapport au poids de la soie est significative sur le plan statistique à un seuil de 1 %. Par ailleurs, on peut observer l'interaction entre la température de rouissage et la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) est significative sur le plan statistique à un seuil de 1 % en ce qui concerne la récupération de soie grège et le % de soie grège.

La diminution significative de la dévidabilité avec une différence de température plus faible entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) entraîne un % de déchets plus élevé (fig. 6), ce qui entraîne une diminution de la récupération de soie grège et du % de soie grège. Cela est dû à un manque de cuisson / à une cuisson inégale des cocons avec une différence de température moins importante entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation).

D'après les valeurs CD (Tableau I), les températures de rouissage entre 60° C et 70° C et entre 60° C et 80° C donnent des différences significatives pour la récupération de soie grège, le % de soie grège et le % de déchets par rapport au poids de la soie tandis que les différences pour ces caractéristiques ne sont pas significatives pour une température de rouissage entre 70 et 80° C.

Par ailleurs d'après les valeurs CD (Tableau I), les différences de température de 15° C, 10° C et 5° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température donnent des différences significatives sur le plan statistique pour le % de soie grège. D'après l'analyse du taux de contribution (Tableau III) on peut observer que la contribution de la température de rouissage est plus importante pour la récupération de soie grège, le % de soie grège et le % de déchets que la contribution de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation).

CONCLUSION

D'après les résultats et l'analyse ci-dessus, on peut conclure que la quantité d'eau absorbée au cours du pré-traitement des cocons avant la cuisson joue un rôle significatif sur les conditions de

cuisson des cocons qui à leur tour influencent la performance de dévidage des cocons. La température de rouissage joue un rôle prédominant sur la longueur moyenne du filament, la récupération de soie grège, le % de soie grège et le % de déchets tandis que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à faible température (imprégnation) joue un rôle vital sur le dévidage et la longueur sans rupture du filament des cocons. D'après nos résultats, on peut aussi déduire que dans le cas d'une machine à cuisson circulaire pressurisée, une température de rouissage de 70° C à 75° C et une différence de température de 10 à 15 ° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) (la durée requise dépendant de la qualité des cocons) donnent une meilleure performance de dévidage des cocons bivoltins hybrides CSR.

STUDIES ON BIVOLTINE COCOON COOKING - PART II : EFFECT OF RETTING TEMPERATURE AND PERMEATION TREATMENT CONDITION ON QUALITY CHARACTERISTICS OF RAW SILK OF INDIAN BIVOLTINE HYBRID COCOONS

SUBHAS. V. NAIK & T.H. SOMASHEKAR*

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, B.T.M Layout, Madiwala,
Bangalore – 560068, India.

The influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on quality characteristics has been studied using CSR race bivoltine hybrid cocoons. Both retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment found to have significant influence on neatness, cleanness, elongation and cohesion of raw silk. Results show that cocoon cooking condition influence the quality characteristics significantly. From the results it is observed that difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment plays a dominant role on quality characteristics of raw silk as compared to that of retting temperature.

Keywords: Retting temperature, Low temperature water (permeation) treatment, Cleanness, Neatness, Tenacity, Elongation, Cohesion.

INTRODUCTION

Cocoon cooking is an important process in silk reeling, which has a decisive role on quality of raw silk. Selection of proper temperature and duration of cocoon cooking is one of the important process control measures in filature for achieving better quality raw silk. A series of studies have been conducted in Japan with respect to the influence of cocoon cooking conditions on quality of silk (Kinoshita et.al 1982, Yashiro masogo 1968). These studies have been conducted with cocoons of their origin and using conveyor cooking machine. Studies have also been conducted on influence of cocoon cooking temperature and cooking conditions on cohesion, tenacity and elongation of raw silk (Subhas et. al 1995 and 1996). In continuation, the present study has been conducted with CSR race (Indian) bivoltine hybrid cocoons using pressurised circular cooking machine (developed by Central Silk Technological Research Institute, CSB, Bangalore, India) to investigate the influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on quality characteristics of raw silk

MATERIALS AND METHODS

1. Raw material:

Bivoltine hybrid cocoons of CSR2 × CSR4 race were used for the study.

* Author to whom correspondence may be addressed.

2. Drying conditions:

The cocoons were dried in a batch type hot air drier following a temperature profile of 115°C to 50°C for a period of five hours, achieving around 42.67 % degree of drying.

3. Cocoon cooking:

Cocoon cooking was carried out using CSTRI batch type Pressurised circular cocoon cooking machine (Subhas, 2001). The temperature and duration used as per the design of experiment were as follows,

a) Retting conditions(A):

	A1	A2	A3
Temperature	60° C	70°C	80 °C
Duration	1.5 min	1.5 min	1.5 min

b) High temperature (steam) treatment:

Temperature :	90 °C
Duration:	1.5min

c) Low temperature water (permeation):

Temperature:	75 °C	80°C	85°C
Duration :	1.75min	1.75 min	1.75 min

Difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment.

B1	B2	B3
15°C	10°C	5°C

d) Steam cooking :

Temperature :	97°C
Duration :	1 min

e) Adjustment temperature :

Initial temperature	96°C
Duration :	1min

Then water temperature was reduced gradually from 96°C to 70°C in 5minutes by sprinkling water.

(Note: In all the cases after low temperature water (permeation) treatment, cocoons were kept above the water level in cooking machine at 75°C and water temperature was raised to 96°C before cooking treatment for 4 minutes).

4. Brushing:

Cooked cocoons were brushed at 80°C hot water.

5. Reeling conditions:

The cocoons were reeled on CSTRI Multiend reeling

Machine with following parameters:

Reeling speed :	100 mtrs / min
Croissure length :	8cms
Basin water temperature:	40°C

6. Water Quality :

Water having standard characteristics for reeling i. e., 7.1 pH, 70 ppm hardness and 100 ppm Alkalinity was used for the study.

7. Raw silk testing:

The raw silk samples were tested for cleanness, neatness and low neatness characteristics using scriplane tester and cohesion character using Duplan Cohesion tester. Further, tenacity and elongation of raw silk were tested using Instron following standard procedure.

8. Data analysis:

The data collected were statistically analysed.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Neatness, low-neatness and cleanness of raw silk:

From the table-I and figures 1, 2 & 3 it is observed that retting temperature of 70°C has resulted in good neatness, low-neatness and cleanness % as compared to 60°C and 80°C retting temperatures. Influence of retting temperature on low neatness % and cleanness % is statistically significant at 1% level and 5% level respectively (table II). From the interaction effect (table II) it can be observed that, influence of interaction effect of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on low neatness and cleanness is significant (at 5% level). It is to be noted that the absorption of water by cocoon shell (by capillary action) and variation in water absorption is determined by the retting temperature and duration and in turn this influences the uniformity in cooking. If the retting temperature is less, shell layers will not absorb the required moisture uniformly and it will result in uneven / under cooking of cocoons and hence will lead to neatness and cleanness defects in the raw silk (depending upon the cooking duration).

From the figures 1, 2 & 3 it is observed that 15°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment has given good neatness, low neatness and cleanness of raw silk as compared to those of 10°C & 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment. Further, from the figures 1, 2, & 3 it can also be observed that neatness, low neatness % and cleanness % of raw silk increases significantly as difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment increases from 5°C to 15°C. From the figures it can be observed that neatness, low neatness and cleanness of raw silk have been increased from 90% to 95.8%, 85% to 91.7% and 86.3 % to 95.2% respectively as difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment increases from 5°C to 15°C.

From Table II it is observed that difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment has significant (at 1% level) influence on neatness, low neatness and cleanness of raw silk. From Table I (CD values) it can be observed that differences in neatness and low neatness between 15°C & 5°C and 10°C & 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment are significant; whereas between 15°C and 10°C it is insignificant. Differences in cleanness of raw silk between 15°C, 10°C and 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment are significant.

From the results it can be inferred that, even though neatness of the raw silk is expected to be influenced by racial character of cocoons (Takashi Omura 1981), cooking the cocoons to the optimum level is essential to achieve good neatness of raw silk from the cocoons of given race.

Significant reduction in neatness and low neatness and cleanness at 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment can be attributed to under/uneven cooking of cocoons. It is to be noted that in case of under cooking, sericin of the cocoon filament layers (cross over points) will not be softened properly and uniformly leading to occurrence of loops in the cocoon filaments. In addition, because of under cooking, during

reeling the chances of escaping more number of crossover points (between the cocoon layers) at a time (without unwinding) along with cocoon filament during reeling is more leading to the formation of nibs/slugs/hairiness in the thread. Depending upon the size of the defects, these forms neatness or cleanness defects in the thread.

From the contribution ratio analysis (Table III) it is observed that contribution of difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on neatness, low neatness and cleanness of raw silk is significantly more than that of retting temperature.

Table I. Influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature steam treatment and low temperature water treatment on quality characteristics of raw silk (mean values).

Tableau I. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à la vapeur et le traitement à l'eau à basse température sur les caractéristiques qualitatives de la soie grège (valeurs moyennes).

Cooking Parameters	Neatness (%)	Low neatness	Cleanness (%)	Tenacity (g/d)	Elongation (%)	Cohesion (No. of strokes)
<i>Paramètres de cuisson</i>	<i>Netteté (%)</i>	<i>Netteté minimum</i>	<i>Propreté (%)</i>	<i>Ténacité (g/d)</i>	<i>Allongement (%)</i>	<i>Cohésion (Nbre de passages)</i>
A1B1	95.3	90.0	93.7	3.85	23.50	164
A1B2	93.5	87.5	91.5	3.84	23.37	171
A1B3	89.0	85.0	85.7	3.89	21.08	107
A2B1	97.0	95.0	97.5	3.85	23.74	163
A2B2	95.0	94.0	94.0	3.85	23.69	158
A2B3	91.0	85.0	85.7	3.80	21.16	113
A3B1	95.0	90.0	94.5	3.90	22.78	93
A3B2	94.0	90.0	95.0	3.86	22.67	132
A3B3	90.0	85.0	87.5	3.83	21.40	116
CD(P<= 0.05) for						
A	1.7	1.6	1.4	0.03	0.36	7
B	1.7	1.6	1.4	0.03	0.36	7
A × B	2.9	2.8	2.4	0.05	0.62	13

* A- Retting temperature / Température de rouissage: A1 = 60°C, A2 = 70°C & A3 = 80°C.

B- Difference in temperature between high temperature treatment (90°C constant) and low temperature treatment / Différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90°C) et le traitement à basse température B1 = 15°C, B2 = 10°C & B3 = 5°C.

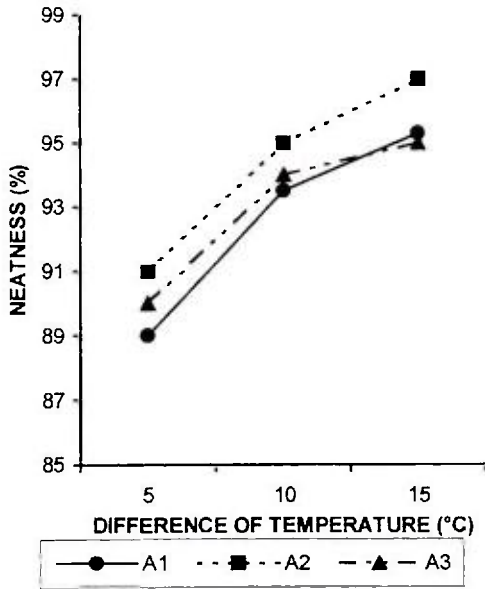


Fig. 1. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on neatness of raw silk.

Fig. 1. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à basse température sur la netteté de la soie grège.

A1 = 60° C retting temp./ temp. de rouissage à 60° C.
A2 = 70° C retting temp./ temp. de rouissage à 70° C.
A3 = 80° C retting temperature / temp. de rouissage à 80° C

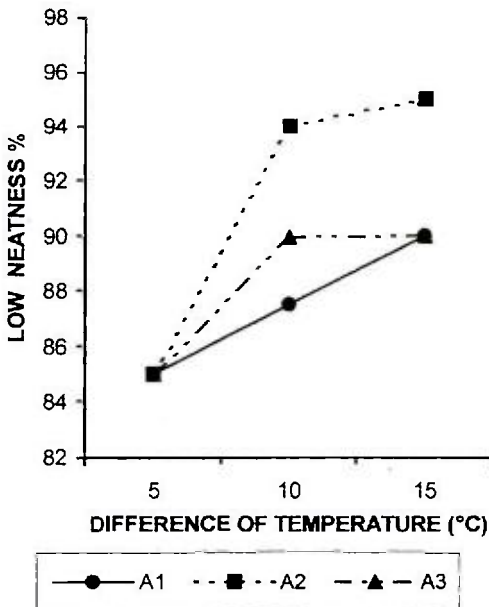


Fig. 2. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on low neatness of raw silk.

Fig. 2. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement de l'eau à basse température sur la netteté minimum de la soie grège.

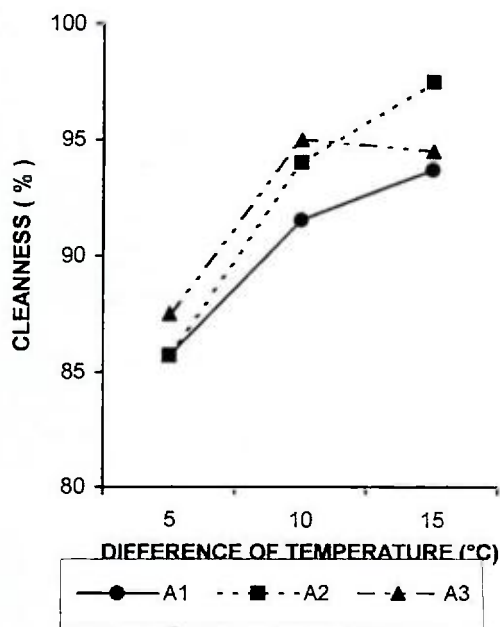


Fig. 3. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on cleanliness of raw silk.

Fig. 3. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à basse température sur la propreté de la soie grège.

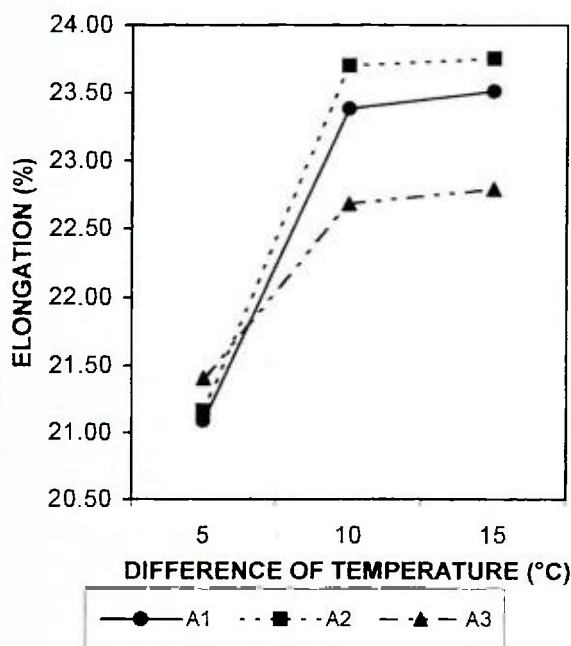


Fig. 4. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on elongation of raw silk.

Fig. 4. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à basse température sur l'allongement de la soie grège.

Table II. Analysis of variance of quality characteristics of raw silk of bivoltine hybrid cocoons.*Tableau II. Analyse de variance pour les caractéristiques qualitatives de la soie grège des cocons hybrides bivoltins.*

Factors	Mean sum of squares						
	Degree of freedom	Neatness	Low neatness	Cleanness	Tenacity	Elongation	Cohesion
<i>Facteurs</i>		<i>Moyenne de la somme des carrés</i>					
	<i>Degré de liberté</i>	<i>Netteté</i>	<i>Netteté minimum</i>	<i>Propreté</i>	<i>Ténacité</i>	<i>Allongement</i>	<i>Cohésion</i>
A	2	4.942 ^{NS}	24.389**	8.687*	0.001517 ^{NS}	0.516*	2070.722**
B	2	53.176**	76.056**	134.294**	0.0007167 ^{NS}	8.695**	2706.889**
A × B	4	0.276 ^{NS}	6.889*	4.077*	0.002233*	0.291*	1000.389**
Replication <i>Répétition</i>	1	2.276 ^{NS}	2.722 ^{NS}	0.605**	0.006422**	1.406**	2.000 ^{NS}
Error / <i>Ecart</i>	8	1.551	1.472	1.100	0.000447	0.072	29.375

A – Retting temperature / *Température de rouissage*: A1 = 60° C, A2 = 70° C & A3 = 80° C.B – Difference in temperature between high temperature treatment (90° C constant) and low temperature treatment / *Différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à basse température*. B1 = 15° C, B2 = 10° C & B3 = 5° C.** Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %*.* Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %*. NS Non significant / *Non significatif*.**Tenacity and elongation:**

From Table II it can be observed that influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on elongation of raw silk is statistically significant at 5% and 1% level respectively. Whereas these temperatures do not have any significant influence on tenacity of raw silk. Further, from Table II it can also be observed that interaction effect of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on tenacity and elongation of raw silk is significant at 5% level.

From figure-4 it is observed that retting temperature of 70°C has given better elongation of raw silk as compared to 60°C & 80°C. From the CD values (Table I) it is observed that differences in elongation of raw silk between retting temperatures of 60°C & 80°C and 70°C & 80°C are significant; whereas that between 60°C & 70°C is insignificant.

From figure-4 it is observed that 70°C retting temperature and 15°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment combination have given better elongation as compared to other combinations. Whereas 80°C retting

temperature and 5° C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment have reduced the elongation of raw silk significantly. From figure- 4 it can also be observed that as the difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment increases from 5°C to 15°C elongation of raw silk is found to increase significantly.

From the CD values (Table I) it is observed that differences in elongation of raw silk between 15°C & 5°C and between 10°C & 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment are significant.

Significant reduction in elongation of raw silk at higher retting temperature is attributed to uneven cooking of cocoons; whereas reduction in elongation of raw silk at lower temperature (5°C) difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment is attributed to under softening of sericin crossover points of cocoon shell due to less water permeation in the cocoon and cocoon shell during the pretreatment of cocoon cooking leading to uneven / under cooking conditions. Under cooking of cocoons will increase the cocoon filament exfoliation tension (Takabayashi 1996). Increased exfoliation tension intum affect the elongation of raw silk.

From the contribution ratio analysis (Table III) it can be observed that contribution of difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on elongation of raw silk is more than that of retting temperature.

Table III. Contribution ratio (%) analysis of cocoon cooking parameters on quality characteristics of raw silk.

Tableau III. Analyse du taux de contribution (%) des paramètres de cuisson du cocon sur les caractéristiques qualitatives de la soie grège.

Cooking parameters	Contribution ratio (%) of cooking paramaters				
	Neatness	Low neatness	Cleanness	Elongation	Cohesion
<i>Paramètres de cuisson</i>	<i>Taux de contribution des paramètres de cuisson (%)</i>				
	<i>Netteté</i>	<i>Netteté minimum</i>	<i>Propreté</i>	<i>Allongement</i>	<i>Cohésion</i>
A	5.14	18.87	4.87	4.12	29.6
B	72.21	61.4	85.47	79.94	38.82

A – Retting temperature / *Température de rouissage*: **A1** = 60° C, **A2** = 70° C & **A3** = 80° C

B – Difference in temperature between high temperature treatment (90° C constant) and low temperature treatment **B1** = 15° C, **B2** = 10° C & **B3** = 5° C / *Différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à faible température* **B1** = 15° C, **B2** = 10° C & **B3** = 5° C.

Cohesion of raw silk:

From Table II it is observed that influence of retting temperature and difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment on cohesion of raw silk is statistically significant at 1% level. From figure-5 it can be observed that 60°C & 70°C retting temperatures have resulted in good cohesion of raw silk as compared to that of 80°C retting temperature. From Table I (CD values) it can be observed that differences in the cohesion of raw silk between 60°C & 80°C and between 70°C & 80°C retting temperatures are significant at 1% level; whereas that between 60°C & 70°C is insignificant.

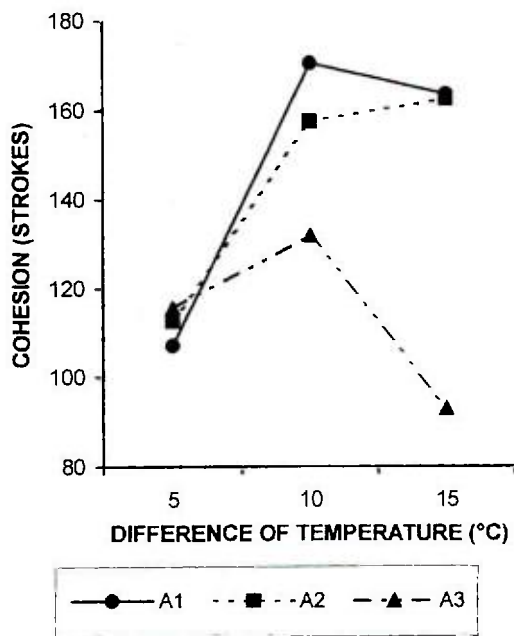


Fig. 5. Influence of retting temperature and difference temperature between high temperature steam (90° C const.) treatment and low temperature water treatment on cohesion of raw silk.

Fig. 5. Influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (constante à 90° C) et le traitement à l'eau à basse température sur la cohésion de la soie grège

Reduction in cohesion of raw silk at higher retting temperature may be attributed to the fact that, when the higher temperature is used sericin on the cocoon layers will be softened more than required level leading to blocking of the pores in the cocoon shell. This will affect the air removal from the cocoon during high temperature steam treatment (for given duration). Because of hindrance to air removal from cocoons, required quantity of water is not permeated into the cocoon during the following processes of low temperature of water (permeation) treatment resulting in uneven cooking of cocoons particularly inside layers of the cocoon shell. Because of uneven cooking, sericin softening and swelling of cocoon shell layers will not be uniform and not to the required level and hence will affect the elongation and cohesion of raw silk.

From Table II it can be observed that difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment influences significantly (at 1% level) the cohesion of raw silk. From Table-I (CD values) it can be observed that differences in cohesion of raw silk between 15°C, 10°C and 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment are statistically significant at 1% level. Even though cohesion of raw silk is good in all the cases, from the figure it can be seen that 10°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment has given significantly better cohesion of raw silk as compared to other two 15°C & 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low

temperature water (permeation) treatment, which may be due to better swelling of sericin. Significant reduction in cohesion of raw silk at 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment is attributed to under cooking of cocoons. Because of under cooking of cocoons at 5°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment, sericin is not softened and swollen to the required level leading to less agglutination of the filaments in the raw silk thread and hence resulting in reduction in cohesion in raw silk. Results confirm prediction made by the earlier work (Subhas.V.Naik, 1995).

CONCLUSION

From the above results and analysis it is concluded that the amount of water absorption in pre-treatment of cocoon cooking plays a significant role on the cocoon cooking conditions which in turn influence the quality of raw silk. Difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment plays a dominant role on quality characteristics of raw silk as compared to that of retting temperature. From the results it can be inferred that in case of Pressurised circular cooking machine, 70°C ~ 75°C retting temperature and 10~15°C difference in temperature between high temperature (steam) treatment and low temperature water (permeation) treatment with 75°C ~ 80°C temperature in the low temperature water (permeation) treatment zone (with required duration depending on cocoon quality) results in better quality raw silk from CSR hybrid bivoltine cocoons.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the technical staff of reeling division of CSTRI, Bangalore for their active support.

REFERENCES

- KINOSHITA. H, SUGANUMA.Y, WATASE.H. (1982) Effectiveness of pretreatment on steam cooking with respect to moisture content part-I, Bull. Nagano pref. Textile Res. Inst. 10, 32-35.
- KINOSHITA. H, SUGANUMA.Y, WATASE.H. (1982) Effectiveness of pretreatment on steam cooking with respect to moisture content part II. J.Silk Sci. Tech. Japan
- YOSHIRO MASAGO, SHIRO ONO, FUSAKICHI NAKAGAWA (1968) "On the rheological properties of raw silk in various condition for silk reeling, Report of silk science research institute, Japan, No. 16, 47-62
- SUBHAS.V.NAIK, HARIRAJ.G MAHESH.K.N., B.N.LAKSHMIPATHAIAH & SOMASHEKAR.T.H.(2000) "Bivoltine silk reeling technology package for reeling international grade raw silk from CSR hybrid bivoltine cocoons" Paper presented during National conference on "Strategies for Sericulture Research & Development in the new millennium" held at CSR&TI, Mysore, India, from 16th to 18th November 2000.
- TAKASHI OMURA (1981) "Silk reeling techniques in the tropics" book published by Japan International Co-operation Agency, Tokyo, Japan, 48-49.
- TAKABAYASHI. C. SUBHAS.V. NAIK AND TSUBOI. H. (1996) " Influence of cocoon cooking conditions on variation of cocoon filament exfoliation tension", Journal of sericultural science of Japan, 65 (4), 278-285.
- SUBHAS.V. NAIK, C.TAKABAYASHI, T.H. SOMASHEKAR & H.TSUBOI (1995), " Influence of cocoon cooking temperature on cohesion of raw silk" *Sericologia* 35(3), 513 - 520
- SUBHAS. V. NAIK, C. TAKABAYASHI, T.H. SOMASHEKAR (1996), " Influence of cocoon cooking conditions and reeling speed on the reeling tension, tenacity and elongation of raw silk" *Sericologia* 36(2), 305 - 313.

ETUDES SUR LA CUISSON DES COCONS BIVOLTINS - DEUXIEME PARTIE : EFFET DE LA TEMPERATURE DE ROUISSAGE ET DES CONDITIONS DU TRAITEMENT D'IMPREGNATION SUR LES CARACTERISTIQUES DE QUALITE DE LA SOIE GREGE DE COCONS HYBRIDES BIVOLTINS INDIENS

SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR*

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, B. T. M. Layout, Madiwal,
Bangalore – 560 068, Inde.

Nous avons étudié l'influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur les caractéristiques qualitatives en utilisant des cocons hybrides bivoltins de la race CSR. Il s'avère que la température de rouissage et la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) ont une influence significative sur la netteté, la propreté, l'allongement et la cohésion de la soie grège. Les résultats montrent que les conditions de cuisson du cocon influencent les caractéristiques de qualité de manière significative. D'après les résultats, nous observons que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement de l'eau à basse température (imprégnation) joue un rôle prédominant sur les caractéristiques qualitatives de la soie grège par comparaison à la température de rouissage.

INTRODUCTION

La cuisson du cocon est un processus important du filage de la soie, qui a un rôle décisif sur la qualité de la soie grège. La sélection d'une température et d'une durée de cuisson des cocons correctes est l'une des mesures importantes de contrôle du processus de la filature pour obtenir une meilleure qualité de soie grège. Une série d'études a été réalisée au Japon sur l'influence des conditions de cuisson des cocons sur la qualité de la soie (Kinoshita et coll., 1982, Yashiro Masogo, 1968). Ces études ont été réalisées avec des cocons provenant du Japon et en utilisant une machine de cuisson avec un convoyeur. Des études ont aussi été réalisées sur l'influence de la température de cuisson des cocons et des conditions de cuisson sur la cohésion, la ténacité et l'allongement de la soie grège (Subhas et coll., 1995 et 1996). L'étude actuelle a été réalisée dans leur continuité avec des cocons hybrides bivoltins de la race CSR (indienne) en utilisant une machine de cuisson circulaire pressurisée (mise au point par le *Central Silk Technological Research Institute*, CSB, à Bangalore, en Inde) pour étudier l'influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur les caractéristiques qualitatives de la soie grège.

* Auteur auquel adresser la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

1. Matières premières :

Des cocons hybrides bivoltins de la race CSR2 × CSR4 sont utilisés pour l'étude.

2. Conditions de séchage :

Les cocons sont séchés dans un séchoir à air chaud en série en suivant un programme de température de 115° C à 50° C pendant une période de cinq heures pour un degré de séchage de 42,67 %.

3. Cuisson des cocons :

On procède à la cuisson des cocons en utilisant une machine circulaire de cuisson pressurisée des cocons en série du CSRTI (Subhas 2001). La température et la durée au cours de l'expérience sont les suivantes :

a) Conditions de rouissage (A) :

	A1	A2	A3
Température	60° C	70° C	80° C
Durée	1,5 min	1,5 min	1,5 min

b) Traitement à température élevée (vapeur) :

Température	90° C
Durée	1,5 min

c) Eau à basse température (imprégnation)

Température	75° C	80° C	85° C
Durée	1,75 min	1,75 min	1,75 min

Différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation).

B1	B2	B3
15° C	10° C	5° C

d) Cuisson à la vapeur

Température	97° C
Durée	1 min

e) Température d'ajustement :

Température initiale	96° C
Durée	1 min

Puis la température de l'eau est diminuée progressivement de 96° C à 70° C en 5 minutes en vaporisant de l'eau.

(Note : Dans tous les cas après le traitement à l'eau à basse température (imprégnation), les cocons sont conservés au-dessus du niveau de l'eau dans une bassine de cuisson à 75° C et on augmente la température de l'eau à 96° C avant le traitement de cuisson pendant 4 minutes).

4. Purgeage :

Les cocons cuits sont purgés avec une eau chaude à 80° C.

5. Conditions de dévidage :

Les cocons sont dévidés sur une machine de dévidage multibouts du CSRTI avec les paramètres suivants :

Vitesse de dévidage	100 m / min
Longueur de croisure	8 cm
Température de l'eau de la cuvette	40° C

6. Qualité de l'eau :

On utilise une eau avec les caractéristiques habituelles pour le dévidage, c'est à dire un pH à 7,1, une dureté de 70 ppm et une alcalinité de 100 ppm.

7. Test de la soie grège :

Les échantillons de soie grège sont testées pour leurs caractéristiques de propreté, de netteté et de netteté minimum en utilisant un testeur scriplane et pour les caractères de cohésion en utilisant un testeur de cohésion Duplan. De plus, on teste la ténacité et l'allongement de la soie grège en suivant la procédure habituelle Instron.

8. Analyse des données :

Les données recueillies sont analysées de manière statistique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Netteté, netteté minimum et propreté de la soie grège :

D'après le Tableau I et les figures 1, 2 & 3, on observe que la température de rouissage de 70° C donne de bons pourcentages de netteté, de netteté minimum et de propreté par comparaison à des températures de rouissage de 60° C et 80° C. L'influence de la température de rouissage sur le % de netteté minimum et le % de propreté est significative sur le plan statistique à un seuil respectivement de 1 % et 5 % (Tableau II). On peut observer que l'influence de l'effet de l'interaction entre la température de rouissage et la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement de l'eau à basse température (imprégnation) est significative sur la netteté minimum et la propreté au seuil de 5 % (Tableau II). L'absorption de l'eau par la coque soyeuse (par action capillaire) et la variation de l'absorption de l'eau sont déterminées par la température et la durée de rouissage et à leur tour elles influencent l'uniformité de la cuisson. Si la température de rouissage est faible, les couches de la coque n'absorbent pas l'eau requise de manière uniforme et cela entraîne une cuisson mauvaise / inégale des cocons, ce qui se traduit par des défauts de netteté et de propreté de la soie grège (en fonction de la durée de cuisson).

D'après les figures 1, 2 & 3, on observe qu'une différence de température de 15° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) donne de bonnes netteté, netteté minimum et propreté de la soie grège par comparaison à une différence de température de 10° C et 5° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation). De plus, d'après les figures 1, 2 et 3 on peut aussi observer que la netteté, le % de netteté minimum et le % de propreté de la soie grège augmentent de manière significative alors que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) augmente de 5° C à 15° C. D'après les figures, on peut observer que la netteté, la netteté minimum et la propreté de la soie grège augmentent respectivement de 90 à 95,8 %, de 85 à 91 % et de 86,3 % 95,2 % alors que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) augmente de 5° C à 15° C.

D'après le Tableau II, on observe que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) a une influence significative à un seuil de 1 % sur la netteté, la netteté minimum et la propreté de la soie grège. On

peut observer dans le Tableau I (valeurs CD), que les différences de netteté et de netteté minimum sont significatives entre 15° C et 5° C et entre 10° C et 5° C de différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température; tandis qu'elles ne sont pas significatives entre 15° C et 10° C. Les différences de propreté de la soie grège entre une différence de température de 15° C, 10° C et 5° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sont significatives.

D'après les résultats, on peut en déduire que bien qu'on puisse supposer que la netteté de la soie grège soit influencée par l'origine des cocons (Takashi Omura, 1981), la cuisson des cocons au niveau optimum est essentielle pour atteindre une bonne netteté de la soie grège chez des cocons d'une race donnée.

La diminution significative de la netteté et de la netteté minimum et de la propreté avec une différence de température de 5° C entre un traitement à température élevée (vapeur) et un traitement à l'eau à basse température (imprégnation) peut être attribuée à un manque de cuisson ou à une cuisson inégale des cocons. On doit noter que dans le cas d'un manque de cuisson, la série des couches du cocon (points de croisement) ne ramollit pas correctement et uniformément, ce qui entraîne la présence de boucles dans les filaments des cocons. De plus, à cause du manque de cuisson, les risques de perdre un plus grand nombre de points de croisement (entre les couches du cocon) à un moment donné (sans déroulement) le long du filament du cocon pendant le dévidage conduisent à la formation de petits bouchons et au peluchage du fil. Selon la taille des imperfections, on obtient des défauts de netteté et de propreté du fil.

D'après l'analyse du taux de contribution (Tableau III), on observe que la contribution de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à faible température par rapport à la netteté, la netteté minimum et à la propreté de la soie grège est significativement plus importante que celle de la température de rouissage.

Ténacité et allongement :

D'après le Tableau II, on peut observer que l'influence de la température de rouissage et de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) est significative sur le plan statistique à un seuil de respectivement 5 % et 1 % pour l'allongement de la soie grège. Ces températures n'ont pas d'influence significative sur la ténacité de la soie grège. De plus, d'après le Tableau II, on peut observer que l'interaction entre la température de rouissage et la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur la ténacité et l'allongement de la soie grège est significative au seuil de 5 %.

D'après la figure 4, la température de rouissage de 70° C donne un meilleur allongement de la soie grège qu'à 60° C et 80° C. D'après les valeurs CD (Tableau I), les différences d'allongement de la soie grège entre des températures de rouissage de 60° C et 80° C et de 70° C et de 80° C sont significatives ; tandis qu'entre 60° C et 70° C, la différence n'est pas significative.

Sur la figure 4 on observe qu'une température de rouissage de 70° C et une différence de température de 15° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) donnent un meilleur allongement par comparaison aux autres combinaisons. Tandis qu'une température de rouissage de 80° C et une différence de 5° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) diminuent l'allongement de la soie grège de manière significative. D'après la figure 4, on peut aussi observer que lorsque la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) augmente de 5° C à 15° C, l'allongement de la soie grège augmente de manière significative.

D'après les valeurs CD (Tableau I), on observe que les différences d'allongement de la soie grège sont significatives avec une différence de température entre le traitement à température élevée

(vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) entre 15° C et 5° C et entre 10° C et 5° C.

La baisse significative de l'allongement de la soie grège à une température de rouissage plus élevée est attribuée à une cuisson irrégulière des cocons ; tandis que la diminution de l'allongement de la soie grège avec une différence de température inférieure (5° C) entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) est attribuée à un manque de ramollissement des points de croisement de la sérécine de la coque soyeuse à cause d'une baisse de l'imprégnation de l'eau dans le cocon et la coque soyeuse pendant le pré-traitement de cuisson des cocons, ce qui entraîne un manque de cuisson ou une cuisson inégale. Le manque de cuisson des cocons augmente la tension d'exfoliation du filament de cocon (Takabayashi, 1996). L'augmentation de la tension d'exfoliation a un effet à son tour sur l'allongement de la soie grège.

D'après l'analyse du taux de contribution (Tableau III), on peut observer que la contribution de la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) sur l'allongement de la soie grège est plus importante que celle de la température de rouissage.

Cohésion de la soie grège :

D'après le Tableau II, l'influence de la température de rouissage et la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) sur la cohésion de la soie grège est significative sur le plan statistique à un seuil de 1 %. Sur la figure 5, on peut observer que des températures de rouissage de 60° C et de 70° C donnent une bonne cohésion de la soie grège par comparaison à une température de rouissage de 80° C. D'après le Tableau I (valeurs CD), on peut observer que les différences de cohésion de la soie grège entre des températures de rouissage de 60° C et 80° C et de 70° C et 80° C sont significatives au seuil de 1 % tandis qu'il n'y a pas de différence significative entre 60° C et 70° C.

La diminution de la cohésion de la soie grège avec une température de rouissage plus élevée pourrait être attribuée au fait que quand on utilise une température plus élevée, la sérécine ramollit plus que nécessaire, ce qui entraîne le blocage des pores de la coque soyeuse. Cela a un effet sur l'évacuation de l'air du cocon pendant le traitement à température élevée à la vapeur (pendant une durée donnée). En raison de l'entrave à l'évacuation de l'air des cocons, la quantité d'eau requise n'imprègne pas le cocon pendant les processus suivants de traitement de l'eau à basse température (imprégnation) ce qui entraîne une cuisson irrégulière des cocons particulièrement des couches internes de la coque soyeuse. En raison de la cuisson irrégulière, l'amollissement et le gonflement de la sérécine des couches de la coque soyeuse ne sont pas uniformes et n'atteignent pas le niveau requis, cela a donc un effet sur l'allongement et la cohésion de la soie grège.

D'après le Tableau II, on peut observer que la différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) influence de manière significative (au seuil de 1 %) la cohésion de la soie grège. D'après le Tableau I (valeurs CD), on peut observer que les différences de cohésion de la soie grège pour une différence de température de 15° C, 10° C et 5° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température sont significatives sur le plan statistique à un seuil de 1 %. Bien que la cohésion de la soie grège soit bonne dans tous les cas, on peut voir qu'une différence de température de 10° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) donne une cohésion de la soie grège significativement meilleure par comparaison aux deux autres différences de 15° C et de 5° C, ce qui pourrait être dû à un meilleur gonflement de la sérécine. La diminution de la cohésion de la soie grège avec une différence de température de 5° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à basse température (imprégnation) est attribuée au manque de cuisson des cocons. En raison du manque de cuisson des cocons avec une différence de température de 5° C, la sérécine ne s'amollit pas et ne gonfle pas au niveau requis, ce

qui entraîne une agglutination inférieure des filaments du fil de soie grège et donc une diminution de la cohésion de la soie grège. Ces résultats confirment les résultats antérieurs (Subhas V. Naik, 1995).

CONCLUSION

D'après les résultats et l'analyse ci-dessus, nous concluons que la quantité d'absorption de l'eau pendant le pré-traitement de cuisson des cocons joue un rôle significatif sur les conditions de cuisson des cocons qui à leur tour influencent la qualité de la soie grège. La différence de température entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation) joue un rôle prédominant sur les caractéristiques qualitatives de la soie grège par comparaison à la température de rouissage. D'après les résultats, on peut en déduire que dans le cas d'une machine de cuisson circulaire pressurisée, une température de rouissage de 70 à 75° C et une différence de température de 10 à 15° C entre le traitement à température élevée (vapeur) et le traitement à l'eau à basse température (imprégnation), avec une température de 75° C à 80° C dans la zone de traitement à l'eau à basse température (imprégnation) (la durée nécessaire dépendant de la qualité des cocons) donnent une soie grège de meilleure qualité avec des cocons hybrides bivoltins CSR.

VARIATIONS IN BIOCHEMICAL CONSTITUENTS IN RELATION TO MATURITY OF LEAVES AMONG SEVEN MULBERRY VARIETIES

U. S. P. SINHA, K. NEOG, G. RAJKHOWA & R. CHAKRAVORTY

Centre for Integrated Sericulture Research, Jamuguri, Rowriah, Jorhat-785005, Assam, India.

Leaves at different stages of maturity of the seven mulberry varieties namely, S₁₆₃₅, V₁, SV₁, MR₂, RFS₁₇₅, JRH and Jatinuni, grown under the agroclimatic conditions of Jorhat, Assam(India) were analysed for five biochemical constituents i. e. moisture, total minerals, total carbohydrates, crude protein and crude fibre content during spring, rainy and autumn rearing seasons. The results revealed that S₁₆₃₅ is the best among the seven mulberry varieties followed by SV₁ and JRH in respect of the biochemical constituents studied. The analyses further indicated that leaf quality decreases gradually with age from apical end of the branch.

Keywords: Mulberry, biochemical, silkworm, leaf quality, agro-climatic.

INTRODUCTION

It is the primary aim of every sericulturist to boost the production of quality cocoons. Growth and development of mulberry silkworm *Bombyx mori* L and subsequent cocoon production depend mainly on the nutritional composition of mulberry leaf (Krishnaswami *et al.*, 1971; Bhuyian, 1981). Several studies have shown the importance of quality of mulberry leaves in silkworm rearing (Bianchidi, 1955; Abdullaev *et al.*, 1964; Fonseca *et al.*, 1993; Sarkar *et al.*, 1997). Better the quality of leaves, greater are the possibilities of obtaining good cocoon crops. Hence, various studies were undertaken to establish the suitability of different mulberry varieties in various agro-climatic conditions (Pillai and Jolly, 1985).

Six newly recommended mulberry varieties i. e., S₁₆₃₅, V₁, SV₁, MR₂, RFS₁₇₅, and JRH have been cultivated in the *Centre for Integrated Sericulture Research* (CISR), Jorhat (Assam) farm with Jatinuni as the local variety. Hence, it was thought worthwhile to study the variations in chemical constituents in relation to maturity of leaves among the above seven mulberry varieties to find out the nutritional status of leaves for obtaining good yield of quality cocoons.

MATERIALS AND METHODS

Seven mulberry varieties namely, S₁₆₃₅, V₁, SV₁, MR₂, RFS₁₇₅, JRH and Jatinuni were grown on sandy loam soil under rainfed conditions in the experimental field of *Centre for Integrated Sericulture Research*, Jorhat (Assam) following Randomised Block Design with three replications of 72 plants each at a spacing of 90cm x 90 cm. N : P : K = 150 : 50 : 50 Kg/ha/yr and farm yard manure = 10 MT/ha/yr were applied as a normal dose of fertilizer. During the period of study, 1907 mm annual rainfall was recorded while maximum and minimum temperatures ranged from 21.0-32.1 °C and 10.7 – 26.2 °C, respectively.

Tender (3rd and 4th leaves), medium (8th and 9th leaves) and mature (13th and 14th leaves) of above seven mulberry varieties were collected randomly from each experimental plot separately during spring (March-April), rainy (July-August) and autumn (September-October) rearing seasons. All the biochemical constituents of leaves except moisture were determined on oven dry basis. Moisture, total minerals, total carbohydrates and crude fibre were estimated by the method of AOAC (1955). Kjeldahl's method as described by Vogel (1978) was followed for the determination of total nitrogen. Crude protein was calculated by multiplying the estimated value of the nitrogen content by 6.25. Method as suggested by Arunachalam and Bandopadhyay (1984) was followed to decide the ranking of the five different constituents in respect of above seven varieties, rearing seasons and maturity of leaves.

RESULTS AND DISCUSSION

Data presented in Table I and II showed mean values of the biochemical constituents of leaves of different maturity collected during different rearing seasons. A declining trend in the moisture and protein content was observed from tender to mature leaves in all the varieties and in all seasons. The same result was obtained in the leaves of S₁ and K₂ mulberry plants (Sinha *et al.*, 1993). But, the reverse trend was obtained in respect of total minerals, total carbohydrates and crude fibre content in all the varieties in every season. It may be due to the translocation of minerals from the soil and synthesis of carbohydrates, cellulose and consequently their more deposition in the comparatively older leaves. Sinha *et al.* (1992) also reported that the contents of total minerals and crude fibre increases with the maturity of leaves in all the primary food plants viz., *Terminalia arjuna*, *T. tomentosa* and *Shorea robusta* of tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury.

However, it is evident from the pooled average values of all biochemical constituents of the three types of leaves irrespectively of seasons (Table III) that all the seven varieties differ significantly from one another in respect of all the characters taken into study.

The moisture content of leaves varied from 70.33% in Jatununi to 73.04% in S₁₆₃₅. High moisture content in the leaves has favourable effects on the palatability and assimilability of nutrients and serves as a criteria in estimating the leaf quality (Parpiev, 1968). All the seven mulberry varieties under study are desirable as regard to this character since 70% moisture content and more is opined to be optimum for silkworm rearing (Jolly and Dandin, 1986). The moisture content in the leaves was also observed to be maximum in rainy season (73.72%) followed by autumn (71.68%) and spring (69.49%).

Bose *et al.* (1995) reported that succulent mulberry leaves with less fibre and higher mineral contents stimulate the metabolic activities in silkworm resulting in quantitative improvement of cocoon and silk. Mulberry variety S₁₆₃₅ appears to be the best in this respect because it contained the highest total minerals (10.70%) and the lowest crude fibre (10.31%) contents. The lowest amount of total minerals (9.50%) and the highest amount of crude fibre (10.89%) were estimated in the mulberry varieties MR₂ and V₁ respectively. Further, the highest content of total minerals (10.65%) and the lowest content of crude fibre (9.99%) in the leaves were observed during spring and autumn seasons respectively.

The total carbohydrate content ranged from 19.46% (V₁) to 22.83% (S₁₆₃₅). This observation is similar to that of Purohit and Kumar (1996) who reported that the carbohydrate content of mulberry leaves varies from 18-25%. Further, total carbohydrate content in the leaves was found to be the highest (22.57%) in rainy season and the lowest in autumn season (19.74%).

The role of protein in silkworm nutrition has been emphasized by Fukuda *et al.*, (1959) and Takeuchi (1960). SV₁ (24.52%), JRH (24.36%) and S₁₆₃₅ (24.12%) recorded higher values for this parameter and therefore, it can be considered as desirable food plant for mulberry silkworm. Among the seven mulberry varieties, the local variety Jatununi recorded the lowest value (19.71%). Spring season was found to be the best with respect to leaf protein (26.55%) content.

Table I. Mean values of the biochemical constituents of leaves of different maturity collected during different rearing seasons.**Tableau I. Valeurs moyennes pour les constituants biochimiques de feuilles de maturité différente recueillies pendant différentes saisons d'élevage.**

Parameters <i>Paramètres</i>	Seasons <i>Saisons</i>	Types of leaves <i>Types de feuilles</i>	Mulberry varieties / <i>Variétés de mûrier</i>							LSD at 5%
			S1635	V1	SV1	MR2	RFS175	JRH	Jatinuni	
Moisture (%) <i>Humidité (%)</i>	Spring <i>Printemps</i>	M1	72.25a	71.28ab	72.27a	70.23b	71.10ab	72.29a	70.25b	1.43
		M2	70.10a	69.40ab	70.27a	68.25b	69.30ab	70.44a	68.60b	1.38
		M3	68.41a	67.53b	68.50a	66.37d	67.34bc	68.38a	66.67cd	0.72
		Av.	70.25a	69.40b	70.34a	68.28c	69.25b	70.37a	68.51c	0.66
	Rainy <i>Pluies</i>	M1	77.47a	75.88b	76.32b	74.53c	74.42c	76.50b	74.22c	0.70
		M2	75.27a	74.55a	74.41a	72.73b	72.37b	74.50a	72.25b	1.21
		M3	73.61a	72.93ab	72.33b	70.59c	70.43c	72.41b	70.32c	0.90
		Av.	75.45a	74.46b	74.35b	72.62c	72.41c	74.47b	72.26c	0.52
	Autumn <i>Automne</i>	M1	75.42a	73.65b	74.32b	72.51c	72.28c	74.43b	72.20c	0.85
		M2	73.17a	72.53a	72.41a	70.60b	70.35b	72.57a	70.16b	0.77
		M3	71.64a	70.94ab	70.31b	68.58c	68.41c	70.37b	68.33c	0.71
		Av.	73.41a	72.37b	72.35b	70.56c	70.35c	72.46b	70.23c	0.42
Total Minerals <i>Minéraux totaux (%)</i>	Spring <i>Printemps</i>	M1	9.77a	9.70a	9.60ab	9.90a	9.90a	9.30b	9.80a	0.36
		M2	10.80a	10.40ab	10.60ab	10.20b	10.20b	10.20b	10.40ab	0.42
		M3	12.00ab	12.40a	12.00ab	10.67c	11.80b	11.60b	12.50a	0.50
		Av.	10.86ab	10.83ab	10.73ab	10.26c	10.63b	10.37c	10.90a	0.23
	Rainy <i>Pluies</i>	M1	8.90a	8.27b	8.17b	7.47c	7.83bc	7.47c	8.33ab	0.59
		M2	10.20a	10.03a	10.00a	8.73b	10.00a	9.13b	10.13a	0.60
		M3	12.40a	11.50b	11.30bc	10.97c	11.00c	10.97c	12.23a	0.47
		Av.	10.50a	9.93bc	9.82cd	9.06e	9.61d	9.19c	10.23ab	0.30
	Autumn <i>Automne</i>	M1	9.70a	9.57a	9.57a	8.40b	9.33a	8.47b	9.67a	0.61
		M2	10.77a	10.30a	10.30a	9.30b	10.17a	10.13a	10.30a	0.59
		M3	11.80bc	11.37c	11.93ab	9.83d	11.70bc	11.73bc	12.37a	0.47
		Av.	10.76a	10.41bc	10.60ab	9.18d	10.40bc	10.11c	10.78a	0.30
Total carbohydrates <i>Hydrates de carbone totaux</i>	Spring <i>Printemps</i>	M1	20.00a	17.30d	17.50d	18.80c	19.00bc	19.60ab	18.00d	0.70
		M2	22.50ab	20.00c	20.40c	22.00bc	21.50cd	23.00a	21.00d	0.60
		M3	25.00ab	22.10c	22.50c	24.50bc	24.10c	25.50a	23.20d	0.61
		Av.	22.50a	19.80d	20.10d	21.77b	21.53b	22.70a	20.73c	0.35
	Rainy <i>Pluies</i>	M1	22.00a	18.53d	18.00d	21.00b	20.70b	21.80a	19.50c	0.54
		M2	25.00a	20.50d	20.00d	24.13b	23.50b	24.90a	21.40c	0.70
		M3	27.00a	22.40d	21.80d	26.10b	25.50b	27.00a	23.30c	0.64
		Av.	24.67a	20.48c	19.93f	23.74b	23.23c	24.57a	21.40d	0.34
	Autumn <i>Automne</i>	M1	19.00a	15.80c	16.00c	17.60b	18.00b	18.70a	16.40c	0.60
		M2	21.00a	18.00d	18.30d	19.80c	20.20bc	20.80ab	18.50d	0.66
		M3	24.00a	20.50d	21.10cd	22.50b	23.00b	23.90a	21.40c	0.66
		Av.	21.33a	18.10c	18.47d	19.97c	20.40b	21.13a	18.77d	0.35

Figures with different alphabets differ significantly. M₁, M₂ and M₃ stand for tender, medium and mature leaves, respectively. / Les valeurs avec des lettres différentes diffèrent de manière significative. / M₁, M₂ et M₃ signifient respectivement feuilles tendres, moyennes et matures.

Table II. Mean values of the biochemical constituents of leaves of different maturity collected during different rearing seasons.

Tableau II. Valeurs moyennes pour les constituants biochimiques des feuilles de maturité différente recueillies pendant différentes saisons d'élevage.

Parameters <i>Paramètres</i>	Seasons <i>Saisons</i>	Types of leaves <i>Types de feuilles</i>	Mulberry varieties / <i>Variétés de mûrier</i>							LSD at 5%
			S1635	V1	SV1	MR2	RFS175	JRH	Jatinuni	
Crude protein <i>Protéines brutes</i>	Spring <i>Printemps</i>	M1	30.06a	29.36	29.81a	28.75a	24.94c	28.77a	26.48b	1.25
		M2	28.48a	27.44ab	28.25ab	27.48ab	23.73c	26.88b	24.21c	1.36
		M3	27.65a	26.25b	26.96ab	26.29b	20.42d	24.63c	20.42d	1.28
		Av. / <i>Moye.</i>	28.73a	27.68bc	28.34ab	27.51c	23.03e	26.76d	23.70c	0.70
	Rainy <i>Pluies</i>	M1	24.21b	28.29a	27.71a	27.42a	24.81b	27.42a	21.59c	2.28
		M2	23.34c	23.63c	25.38b	25.38b	19.84d	26.84a	18.09c	1.15
		M3	20.41a	21.59a	20.71a	17.79bc	18.38b	21.96a	16.73c	1.56
		Av. / <i>Moye.</i>	22.65b	24.50a	24.60a	23.53b	21.01c	25.40a	18.80d	0.94
	Autumn <i>Automne</i>	M1	22.46bc	20.42d	25.08a	22.75bc	21.59cd	23.05b	18.08e	1.22
		M2	21.79a	19.84bc	21.59a	20.71ab	18.67c	21.00ab	16.05d	1.33
		M3	18.67a	18.38a	15.17b	15.75b	17.00ab	18.67a	15.75b	1.77
		Av. / <i>Moyen.</i>	20.97a	19.54b	20.61a	19.74b	19.09b	20.90a	16.63c	0.79
Crude fibre <i>Fibres brutes</i>	Spring <i>Printemps</i>	M1	9.23ab	9.90c	9.00a	9.70bc	9.50abc	9.70bc	9.00a	0.58
		M2	10.40ab	10.80c	10.10a	10.50abc	10.30ab	10.60bc	10.50abc	0.49
		M3	c	11.50bc	11.60bc	11.50bc	11.57bc	11.80c	11.30b	0.49
		Av. / <i>Moyen.</i>	10.80a	10.73c	10.23ab	10.57c	10.46bc	10.70c	10.27ab	0.28
	Rainy <i>Pluies</i>	M1	10.13bc	10.30cd	9.13a	9.80bc	9.70b	10.80c	10.47dc	0.50
		M2	d	e	10.43a	10.67a	10.63a	11.63b	11.67b	0.58
		M3	11.43b	11.30b	11.70a	12.13a	11.67a	12.77b	12.10a	0.54
		Av. / <i>Moyen</i>	11.97a	12.97b	10.42a	10.87ab	10.67ab	11.73c	11.41cd	0.30
	Autumn <i>Automne</i>	M1	8.70a	9.80c	8.77ab	9.50c	9.37bc	8.40a	8.33a	0.63
		M2	9.43a	10.27cd	9.90abc	10.47d	10.10bcd	9.67ab	9.40a	0.50
		M3	10.70ab	11.17bc	11.53d	11.37cd	11.60d	10.90abc	10.37a	0.60
		Av. / <i>Moyen.</i>	9.61a	d	10.07b	10.44c	10.36bc	9.66a	9.37a	0.32

Figures with different alphabets differ significantly. **M1**, **M2** and **M3** stand for tender, medium and mature leaves respectively. / Les valeurs avec des lettres différentes diffèrent de manière significative. **M1**, **M2** et **M3** signifient respectivement feuilles tendres, moyennes et mûres.

Table III. Leaf biochemical composition of mulberry varieties (Pooled data of 3 seasons).*Tableau III. Composition biochimique de la feuille de variétés de mûrier (Données regroupées pour 3 saisons).*

Mulberry varieties	Moisture (%)	Total minerals (%)	Total Carbohydrate (%)	Crude protein (%)	Crude Fibre (%)
<i>Variétés de mûrier</i>	<i>Humidité (%)</i>	<i>Minéraux totaux (%)</i>	<i>Hydrates de carbone totaux (%)</i>	<i>Protéines brutes (%)</i>	<i>Fibres brutes (%)</i>
S1635	73.04a	10.70a	22.83a	24.12ab	10.31a
V1	72.08c	10.39b	19.46d	23.91bc	10.89c
SV ₁	72.35bc	10.39b	19.51d	24.52a	10.24a
MR ₂	70.49de	9.50c	21.83b	23.59c	10.63cd
RFS ₁₇₅	70.67d	10.21c	21.72b	21.04d	10.49bc
JRH	72.43b	9.89d	22.80a	24.6ab	10.70d
Jatinuni	70.33e	10.64a	20.30c	19.71c	10.35ab
LSD at 5%	0.31	0.16	0.19	0.46	0.17
Seasons / Saisons					
Spring / Printemps	69.49c	10.65a	21.31b	26.54a	11.11c
Rainy / Pluies	73.72a	9.76c	22.57a	22.93b	10.44b
Autumn / Automne	71.68b	10.32b	19.74c	19.64c	9.99a
LSD at 5%	0.20	0.10	0.13	0.30	0.11
Types of leaves / Type de feuilles					
Tender / Tendres	73.52a	9.00c	18.73c	25.38a	9.49a
Medium / Moyennes	71.63b	10.11b	21.26b	23.27b	10.49b
Mature / Matures	69.73c	11.62a	23.64a	20.46c	11.57c
LSD at 5%	0.20	0.10	0.13	0.30	0.11

Figures with different alphabets differ significantly / Les valeurs avec des lettres différentes diffèrent de manière significative.

Data in table IV indicate the scores allotted to seven mulberry varieties, three seasons and three types of leaves for above five biochemical constituents by the method of Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) where lower values signify higher ranking. It is evident from this table that variety S1635 is the best among the seven mulberry varieties followed by SV₁ and JRH in respect of the constituents taken into study. This table further indicates that rainy season ranks first among three seasons followed by spring and autumn in respect of the above five biochemical constituents. Again, this table also reveals that leaf quality decreases with age from apical end of the branch. This observation corroborates with that of Hanif and Islam (1987) who reported that third and fourth leaves in mulberry were better with respect to nutritive values.

Table IV. Pooled Scores allotted for five different biochemical constituents.

Tableau IV. Résultats regroupés pour cinq constituants biochimiques différents.

Mulberry varieties (population)	Moisture	Total Minerals	Total Carbohydrate	Crude protein	Crude fibre	Total Scores	Rank
Variétés de mûrier (population)	Humidité	Minéraux totaux	Hydrates de carbone totaux	Protéines brutes	Fibres brutes	Total	Classement
S1635	0.20	0.20	0.25	0.30	0.20	1.15	I
SV ₁	0.50	0.40	1.00	0.20	0.20	2.30	II
JRH	0.40	0.80	0.25	0.30	0.80	2.55	III
RFS ₁₇₅	0.80	0.60	0.50	0.80	0.50	3.20	IV
Jatinuni	1.00	0.20	0.75	1.00	0.30	3.25	V
V ₁	0.60	0.40	1.00	0.50	1.00	3.50	VI
MR ₂	0.90	1.00	0.50	0.60	0.70	3.70	VII
Seasons / Saisons							
Rainy / Pluies	0.33	1.00	0.33	0.67	0.67	3.00	I
Spring / Printemps	1.00	0.33	0.67	0.33	1.00	3.33	II
Autumn / Automne	0.67	0.67	1.00	1.00	0.33	3.67	III
Types of leaves / Types de feuilles							
Tender / Tendres	0.33	1.00	1.00	0.33	0.33	2.99	I
Medium / Moyennes	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	3.35	II
Mature / Matures	1.00	0.33	0.33	1.00	1.00	3.66	III

Thus from the present study, it is concluded that variety S1635 is the best among the seven mulberry varieties followed by SV₁ and JRH in respect of the biochemical constituents taken into consideration and leaf quality decreases gradually with age from apical end of the branch.

REFERENCES

- ABDULLAEV I. K., GASANOV D. O. & IMAMKULVER S. D. (1964) Hybrid mulberry in Azerbaijan and its importance in breeding. Trans Azerbaijan Sci. Silk Prod. Russia, 5, 132-153.
- ARUNACHALAM V. & BANDYOPADHYAY A. (1984) A method to make decisions jointly on a number of dependent characters. Indian J. Genet., 44(3), 419-424.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC) (1955) Official methods of analysis, 8th edition, Washington, 99, 373, 118-119, 368.
- BHUYIAN N. I. (1981) Improvement of silkworm multiplication and silk production under Bangladesh condition. Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, 60-61.
- BIANCHIDI A. (1955) The new Kokuso varieties of Japanese mulberry. G. Agric. Domin., Italy, 39 : 582.
- BOSE P. C., SINGHVI N. R. & DATTA R. K. (1995) Effect of micronutrients on the biochemical parameters of mulberry (*Morus alba* L.) leaf. Sericologia, 35(1), 65-69.
- FONSECA T. C., DE ALMEIDA J. E., OKAMOTO F. & DA CUNHA E. A. (1993) Nutritive value of some mulberry clones (*Morus alba* L.). Sericologia, 33(4), 631-633.
- FUKUDA T., SUDA M., MATSUDA M., MAYASHI T., KUROSO T., HORIUSHI Y. & FLORRIN M. (1959) Formation of the silk protein during the growth of the silkworm. Biochem., 12, 90-112.

- FUKUDA T., SUDA M., MATSUDA M., MAYASHI T., KUROSO T., HORIUSHI Y. & FLORRIN M. (1959) Formation of the silk protein during the growth of the silkworm. *Biochem.*, 12, 90-112.
- HANIF M. A. & ISLAM B. N. (1987) Nutrient contents of mulberry leaves and their effect on silk production by *Bombyx mori* L. *Bangladesh J. Zool.*, 15(2): 131-136.
- JOLLY M. S. & DANDIN S. B. (1986) Collection, conservation and evaluation of mulberry (*Morus spp.*) Germplasm. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, pp. 44.
- KRISHNASWAMI S., KUMARARAJ S., VIJAYARAGHAVAN K. & KASIVISWANATHAN K. (1971) Silkworm feeding trials for evaluating the quality of mulberry leaves as influenced by variety, spacing and nitrogen fertilization. *Indian J. Seric.*, 10, 79-89.
- PARPIEV B. A. (1968) Water metabolism in silkworm fed with a different mulberry strains changing diet. *Shelk*, 39, 15-17.
- PILLAI S. V. & JOLLY M. S. (1985) An evaluation of the quality of mulberry varieties raised under hill conditions and the crop results of *B. mori* L. *Indian J. Seric.*, 24(2), 48-52.
- PUROHIT K. M. & KUMAR T. P. (1996) Influence of various agronomical practices in India on the leaf quality in mulberry, a review. *Sericologia*, 36(1), 27-39.
- SARKAR A. A., HAQUE M. R., RAB M. A. & ABSAR N. (1997) Studies on crude protein and amino acid contents of mulberry (*Morus alba* L.) leaves in relation to cocoon production of the silkworm *Bombyx mori*. *Sericologia*, 30(1), 17-22.
- SINHA, U. S. P., SINHA A. K., SRIVASTAVA P. P. & BRAHMACHARI B. N. (1992) Studies on the variations in chemical constituents in relation to maturity of leaves in three primary food plants of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. *Indian J. Seric.*, 31(1), 83-86.
- SINHA, U. S. P., SINHA A. K., SRIVASTAVA P. P. & BRAHMACHARI B. N. (1993) Variation of chemical constituents in relation to maturity of leaves in mulberry varieties S₁ and K₂ under the agro-climatic conditions of Ranchi district. *Indian J. Seric.*, 32(2), 196-200.
- TAKEUCHI Y. (1960) Ability of silkworm (*Bombyx mori* L.) to recover from malnutrition. *The Silk News Letter*, 5(8), 6-7.
- VOGEL A. I. (1978) A text book of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis, 4th edition, Longman Group Ltd., London. 926 p.

VARIATIONS DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES EN FONCTION DE LA MATURITE DES FEUILLES CHEZ SEPT VARIETES DE MURIER

U. S. P. SINHA, K. NEOG, G. RAJKHOWA & R. CHAKARVORTY

Centre for Integrated Sericulture Research, Jamuguri, Rowrah, Jorhat – 785 005, Assam, Inde.

Nous avons procédé à l'analyse de cinq constituants biochimiques, c'est à dire l'humidité, les minéraux totaux, les hydrates de carbone totaux, les protéines brutes et les fibres brutes des feuilles à différents stades de maturité chez sept variétés de mûrier à savoir S₁₆₃₅, V₁, SV₁, MR₂, RFS₁₇₅, JRH et Jatinuni cultivées dans les conditions agro-climatiques de Jorhat, dans l'Assam (Inde) pendant les saisons du printemps, des pluies et de l'automne. Les résultats révèlent que sur les sept variétés de mûrier S₁₆₃₅ est la meilleure pour les constituants biochimiques étudiés suivie par SV₁ et JRH. De plus, les analyses indiquent que la qualité des feuilles baisse progressivement avec l'âge à partir de l'extrémité apicale de la branche.

INTRODUCTION

L'objectif principal du sériciculteur est d'augmenter la production de cocons de qualité. La croissance et le développement du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. et la production de cocons ultérieure dépendent principalement de la valeur nutritive de la feuille de mûrier (Krishnaswami et coll., 1971 ; Bhuyian, 1981). Plusieurs études ont montré l'importance de la qualité des feuilles de mûrier dans l'élevage du ver à soie (Bianchidi, 1955 ; Abdullaev et coll., 1964 ; Fonseca et coll., 1993 ; Sarkar et coll., 1997). Plus la qualité des feuilles est bonne, plus les possibilités d'obtenir de bonnes récoltes de cocons augmentent. Ainsi, des études variées ont été entreprises pour déterminer l'adaptabilité de différentes variétés de mûrier à des conditions agro-climatiques variées (Pillai et Jolly, 1985).

Nous avons cultivé six variétés de mûrier venant d'être recommandées, c'est à dire S₁₆₃₅, V₁, SV₁, MR₂, RFS₁₇₅ et JRH dans une exploitation du *Centre for Integrated Sericulture Research* (CISR), à Jorhat dans l'Assam avec Jatinuni comme variété locale. Nous avons pensé qu'il était pertinent d'étudier les variations des constituants chimiques en fonction de la maturité des feuilles chez ces sept variétés de mûrier pour déterminer l'état nutritionnel des feuilles dans le but d'obtenir un bon rendement de cocons de qualité.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons cultivé les sept variétés de mûrier : S₁₆₃₅, V₁, SV₁, MR₂, RFS₁₇₅, JRH et Jatinuni dans du terreau sablonneux dans des conditions d'arrosage par les pluies sur le terrain expérimental du *Centre for Integrated Sericulture Research*, à Jorhat dans l'Assam en suivant une disposition en Bloc Aléatoires avec trois répétitions de 72 plants chacune et un espacement de 90 cm × 90 cm. N : P : K = 150 : 50 : 50 kg / ha / année et la fumure = 10 MT/ha/ année sont appliqués en doses normales comme engrais. Pendant la période d'étude, on a enregistré une pluviométrie annuelle de 1907 mm tandis que les températures maximum et minimum sont comprises respectivement entre 21

et 32,1° C et 10,7 et 26,2° C. On recueille des feuilles tendres (3^{ème} et 4^{ème} feuilles), moyennes (8^{ème} et 9^{ème} feuilles) et mûres (13^{ème} et 14^{ème} feuilles) chez les sept variétés de mûriers de manière aléatoire dans chaque parcelle expérimentale séparément pendant les saisons d'élevage du printemps (mars-avril), des pluies (juillet – août) et de l'automne (septembre – octobre). On détermine tous les constituants biochimiques des feuilles sauf l'humidité sur la base d'un séchage au four. On estime l'humidité, les minéraux totaux, les hydrates de carbone totaux et les fibres brutes d'après la méthode AOAC (1955). On utilise la méthode Kjeldahl décrite par Vogel (1978) pour la détermination de l'azote total. On calcule les quantités de protéines brutes en multipliant la valeur estimée de la teneur en azote par 6,25. On utilise la méthode suggérée par Arunachalam et Bandopadhyay (1984) pour déterminer le classement des cinq constituants en fonction des sept variétés ci-dessus, des saisons d'élevage et de la maturité des feuilles.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données présentées dans les Tableaux I et II présentent les valeurs moyennes pour les constituants biochimiques des feuilles de différente maturité, recueillies pendant différentes saisons d'élevage. On observe une tendance au déclin pour la teneur en eau et en protéines des feuilles tendres aux feuilles mûres chez toutes les variétés et pendant toutes les saisons. On obtient le même résultat pour les feuilles de mûrier de S1 et K2 (Sinha et coll., 1993). Mais on observe une tendance inverse pour les minéraux totaux, les hydrates de carbone totaux et la teneur en fibres brutes chez toutes les variétés pendant chaque saison. Cela pourrait être dû à la translocation des minéraux du sol et à la synthèse des hydrates de carbone et de la cellulose et par conséquent à leur plus grand dépôt dans les feuilles plus vieilles. Sinha et coll., (1992) ont aussi rapporté que la teneur en minéraux totaux et en fibres brutes augmente avec la maturité des feuilles chez toutes les plantes hôtes primaires, c'est à dire *Terminalia arjuna*, *T. tomentosa* et *Shorea robusta* du ver à soie tassar *Antheraea mylitta* Drury.

Cependant, il est évident d'après le regroupement des valeurs moyennes pour tous les constituants biochimiques chez les trois types de feuilles quelles que soient les saisons (Tableau III) que les sept variétés diffèrent d'une manière significative l'une de l'autre pour tous les caractères pris en compte dans cette étude.

La teneur en humidité des feuilles varie de 70,33 % pour Jatinuni à 73,04 % pour S₁₆₃₅. La teneur élevée en humidité dans les feuilles a des effets favorables sur la saveur et l'assimilation des nutriments et sert de critère pour estimer la qualité de la feuille (Parpiev, 1968). Les sept variétés de mûrier à l'étude sont bonnes en ce qui concerne ce caractère puisqu'on pense qu'une teneur en humidité de 70 % ou plus est optimum pour l'élevage du ver à soie (Jolly et Dandin, 1986). On observe aussi que la teneur en eau de la feuille est maximum pendant la saison des pluies (73,72 %) suivie par l'automne (71,68 %) et le printemps (69,49 %).

Bose et coll., (1995) ont rapporté que les feuilles de mûrier succulentes avec moins de fibres et une teneur plus élevée en minéraux stimulent les activités métaboliques du ver à soie ce qui donne une amélioration de la quantité de cocons et de soie. La variété de mûrier S₁₆₃₅ semble la meilleure à cet égard puisqu'elle contient la quantité la plus élevée de minéraux totaux (10,70 %) et la teneur la plus faible en fibres brutes (10,31 %). On trouve la quantité la plus faible en minéraux totaux (9,50 %) et la plus élevée en fibres brutes (10,89 %) respectivement chez les variétés de mûrier MR₂ et V1. De plus, on observe la teneur la plus élevée en minéraux totaux (10,65 %) et la teneur la plus faible en fibres brutes (9,99 %) dans les feuilles pendant les saisons du printemps et de l'automne respectivement.

La teneur totale en hydrates de carbone est comprise entre 19,46 % (V1) et 22,83 % (S₁₆₃₅). Cette observation est similaire à celle de Purohit et Kumar (1996) qui ont rapporté que la teneur en hydrates de carbone des feuilles de mûrier varie entre 18 à 25 %. De plus, la teneur totale en hydrates de carbone dans les feuilles s'avère être la plus élevée (22,57 %) pendant la saison des pluies et la plus faible à l'automne (19,74 %).

Fukuda et coll., (1959) et Takeuchi (1960) ont souligné l'importance du rôle des protéines dans la nutrition du ver à soie. SV1 (24,52 %), JRH (24,36 %) et S₁₆₃₅ (24,12 %) ont enregistré les valeurs les plus élevées pour ce paramètre et elles peuvent donc être considérées comme des plantes hôtes favorables pour le ver à soie du mûrier. Parmi les sept variétés de mûrier, la variété locale Jatinuni enregistre la valeur la plus faible (19,71 %). On trouve que la saison du printemps est la meilleure en ce qui concerne la teneur en protéine de la feuille (26,55 %).

Les données du tableau IV présentent les classements attribués aux sept variétés de mûrier, trois saisons et trois types de feuilles pour les cinq constituants biochimiques, avec la méthode d'Arunachalam et Bandyopadhyay (1984) où les valeurs les plus faibles signifient le meilleur classement. Il est évident d'après ce tableau que la variété S₁₆₃₅ est la meilleure des sept variétés de mûrier, suivie par SV1 et JRH pour les constituants étudiés. De plus, le tableau indique que la saison des pluies se classe la première parmi les trois saisons, suivie par le printemps et l'automne pour les cinq constituants biochimiques étudiés. Ce tableau révèle aussi que la qualité de la feuille baisse avec l'âge à partir de l'extrémité apicale de la branche. Ces observations confirment celles d'Hanif et Islam (1987) qui ont rapporté que les troisième et quatrième feuilles du mûrier sont meilleures en ce qui concerne leur valeur nutritive.

Nous concluons donc que la variété S₁₆₃₅ est la meilleure des sept variétés de mûrier suivie par SV1 et JRH pour les constituants biochimiques pris en compte et que la qualité de la feuille baisse progressivement avec l'âge à partir de l'extrémité apicale de la branche.

STUDIES ON THE IMPACT OF INFESTATION OF LEAF ROLLER, *DIAPHANIA PULVERULENTALIS* (HAMPSON) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) ON GROWTH AND YIELD OF MULBERRY

S. RAJADURAI, M. MAHENDRA, R. L. KATIYAR* & VINEET KUMAR

Pest Management Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute,
Mysore -570 008, Karnataka, India.

The leaf roller, Diaphania pulverulentalis is a key pest of mulberry plantation in southern sericultural states of India. In view of the economic importance of pest, investigations were carried out on the growth and leaf yield loss of mulberry in relation to age of plant, following the infestation of the plants by the pest in question. The results of the present study clearly indicate that the infestation taken place as early as in young stage (15th day from pruning date) on the apical portion leads to alteration in further growth and leaf yield against the control and late infested plants (30th and 45th days). The tolerance of the plants to leaf roller larvae began to increase as the plant stage advanced. This was evidenced by the result that 45 days old potted plants were less infested by leaf roller larvae and significantly lesser than 15 days old plants.

Keywords: Leaf roller, mulberry, growth, leaf yield.

INTRODUCTION

Plants are utilized by insects to derive nutrients or as shelter. They sustain injury to satisfy the requirements of insects. Such injury to the plants by insects is reflected as economic loss to the cultivators. The extent of damage by insects is decided by many factors such as: i) The stage or part of the plant damaged, ii) The susceptibility of the plant to insect attack and iii) Nature of the injury inflicted by the insect (Ghosh, 1924).

Mulberry (*Morus* species) is the only food plant for the silkworm *Bombyx mori* L. It is the perennial crop cultivated in all types of soils under both rainfed and irrigated conditions. It is prone to depredation by diverse organisms because of its fast growth, nutritional abundance and possession of green foliage throughout the year. So far, more than 300 insect and non-insect species are known to inhabit the mulberry crop system in varying intensities during different stages of crop and season (Naik, 1997).

The species composition of different arthropods infesting mulberry and their effects vary according to agro-climatic conditions, diversity and crop pattern. The major insect species known to inflict damage to mulberry belongs to orders Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Thysanoptera, Orthoptera and Isoptera (Biradar, 1989). In a previously conducted study, Kumar *et al.*, (1994) reported that sericulturists experience a loss in mulberry yield to the tune of 4500 kg/ha/yr due to the infestation by the mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus*.

* Research Extension Centre, Sub-unit, Aurangabad, Maharashtra, India.

In recent years since 1995, a new pest called the leaf roller, *Diaphania pulverulentalis* has been recorded to infest mulberry predominantly in the southern silk producing states of Karnataka, Andhra Pradesh and Tamil Nadu (Siddegowda *et al.*, 1995 ; Geetha Bai *et al.*, 1997 and Rajadurai *et al.*, 1999). In view of considerable leaf yield loss caused (12.18%) and the pest infestation reaching the economic injury level during the peak period of incidence (Rajadurai *et al.*, 1999), Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore has evolved an Integrated Pest Management package to tackle the pest menace in time and effective.

The target site of leaf roller infestation is the apical portion of mulberry shoot. The binding of the tender leaves together by silky salivary secretion and the larvae remaining inside the bound leaves are typical symptom of leaf roller. The larva on taking shelter inside the bound leaves initially devours the soft green tissues and later damages the apical shoot leading to drying up of either part and stunts growth of the plant. The life cycle of *D. pulverulentalis* is comparatively shorter than the other lepidopteran pests of mulberry and it ranges between 17-24 days. As a result, the pest completes 8-10 generations during the period of its occurrence in mulberry gardens.

So far, no systematic study has been carried out on the growth and leaf yield loss of mulberry in relation to age of plant, following the infestation of the plants by the pest in question. Therefore the present investigation has been carried out with the following objectives: i) To study the impact of pest infestation on plant growth in relation to plant age and ii) To estimate the leaf yield loss due to pest attack at different ages of the plant.

MATERIALS AND METHODS

The present investigation was carried out using potted mulberry plants in a glass house. The present study was initiated in the month of June, 1999 and continued till February, 2000. The number of replication maintained was of three each for control and treatment and the replication size is 15 mulberry plants per replication. The temperature and relative humidity under glass house condition ranged between 23 and 28° C and 70 and 85% RH, respectively throughout the period of experimentation.

The leaf roller rearing was conducted in the laboratory following the methods of Anonymous (1998). The larvae were reared on the leaves of M-5 mulberry variety in transparent plastic containers (1.5 liter capacity) with the lids fitted with wire mesh for ventilation. The adult moths were maintained by confining them to the wooden oviposition cages. They were provided with 10% sucrose solution as food and apical mulberry shoots inserted in water filled conical flask as oviposition sites. The first instar larvae of leaf roller were used for studying the effects of the pest infestation on the leaf yield reduction in potted mulberry plants. Two larvae were introduced on each of the apical shoots in order to simulate the natural condition.

The potted plants were pruned at bottom level and kept for experimental study. After 15 days, first instar larvae of leaf roller were introduced on the experimental plants (15 nos). The subsequent inductions of the larvae were carried out on 30 and 45- day old plants. The observation and collection of data were made during each induction in control and experimental plants. Data were recorded in respect of the following parameters: i) number of leaves / plant, ii) shoot length and iii) fresh leaf weight. Based on the available data on the above parameters, reduction in the growth of the infested plants and leaf yield loss *vis-a-vis* the control plants were calculated. All the experimental and control plants were placed separately inside the polytunnel and nylon net barriers in order to prevent the escape of leaf roller larva from the experimental plants and the attack of the plants by other pests besides the leaf roller larvae from outside.

The data collected for control and treatments (15th, 30th and 45th days of infestation) were used for calculating the per cent leaf yield loss due to attack by leaf roller larvae as per the following formula:

$$\text{Leaf yield loss (\%)} = \frac{\text{Leaf yield in control plants} - \text{Leaf yield in treated plants}}{\text{Leaf yield in control plants}} \times 100$$

The results of the present investigation were subjected to statistical analysis by paired "t" test after Rajkumar and Chandrashekara Rao (1992).

RESULTS

Effect of leaf roller infestation on growth of mulberry at different growth stage:

Results on the effect of leaf roller infestation on the growth parameters like shoot length and number of leaves/plant at different age of the potted mulberry plants (15, 30 and 45 days) are furnished in Fig.1. The mean shoot length of treated and control plants indicate that the influence of infestation on shoot growth was more pronounced when the infestation occurred on the 15 day old plants (33.53 ± 5.17 cm) compared to treatments involving 30-day old (48.33 ± 8.47 cm) and 45 day old (57.8 ± 9.84 cm) plants. The control plants recorded a shoot length of 60.47 ± 10.40 cm.

Similar trend was observed for the results pertaining to mean number of leaves per plant. The values for this parameter for 15, 30 and 45 day old plants were 26.6 ± 4.37 , 31.4 ± 4.5 and 32.87 ± 5.04 respectively. In control, the mean number of leaves per plant was 36.2 ± 4.63 (Fig. 1).

The level of significance as tested by paired 't' test revealed that it was significant at 1% level ($P < 0.01$) between all three stages of treatment (15th, 30th and 45th day) for mean shoot length (cm). On the other hand, a significant level of 1% ($P < 0.01$) was observed between 15th day - 30th day and 15th - 45th day, whereas it was significant at 5% level ($P < 0.05$) between 30th - 45th day. The results of the 't' test indicate that 1% level of significance ($P < 0.01$) was achieved for mean shoot length (cm) between the control and treatments of 15th and 30th day, whereas it was significant at 5% level ($P < 0.05$) in 45th day of control and treatment.

Effect of leaf roller infestation on leaf yield of mulberry at different growth stage:

The results of the leaf yield parameters like leaf weight and leaf yield loss of both treatments (15th, 30th and 45th day mulberry potted plants after induction of leaf roller larvae infestation) and control are presented in Fig. 1 and Table I, respectively.

Table I. Effects of Leaf roller infestation on leaf yield loss at various stages of treatment.

Tableau I. Effet de l'infestation par l'enrouleur de la feuille sur la perte de rendement foliaire à plusieurs stades du traitement.

Sl No.	Age of plant infested	Leaf yield loss (%) *
<i>No. de série</i>	<i>Age de la plante infestée</i>	<i>Perte de rendement foliaire (%)</i>
1.	15 Days / 15 jours	34.83
2.	30 Days / 30 jours	23.68
3.	45 Days / 45 jours	20.09

* Observations from 60 days old potted plants / *Observations chez des plants en pots âgés de 60 jours.*

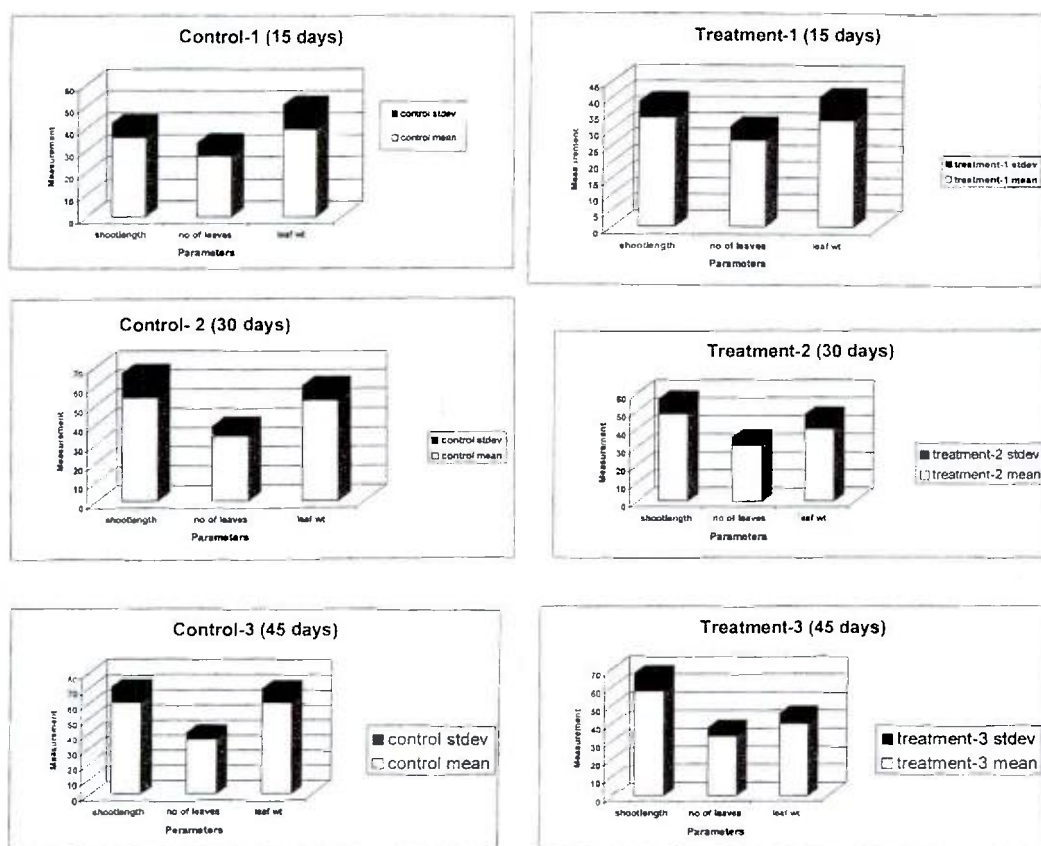


Fig. 1. Impact of different growth and yield parameters (shoot length –cm, number of leaves per plant and leaf weight –g) at different stages of growth of mulberry in control and treatment (Control & Treatment-1; 15 days, Control & Treatment-2 ; 30 days and Control & Treatment-3; 45 days).

Fig 1. Impact de différents paramètres de croissance et de rendement (longueur de la tige – cm, nombre de feuilles par plante et poids de la feuille – g) à différents stades de croissance du mûrier chez le témoin et le traité (témoin & traitement – 1 : 15 jours, témoin & traitement-2 : 30 jours et témoin & traitement-3 : 45 jours).

The mean leaf weight (g/plant) was lower in 15th day (32.73 ± 7.31) than 30th day (38.63 ± 6.73) and 45th day (40.13 ± 8.14) infested plants, whereas it was comparatively higher in control potted plants (50.22 ± 9.65). The results presented in Table- 1 emphasised that leaf yield loss (%) was maximum in 15th day (34.83) than 30th (25.68) and 45th day (20.09). The statistical analysis (paired 't' test) revealed that 1% level of significance ($P < 0.01$) was recorded between the treatments, i.e. 15th - 30th and 15th - 45th day in mean leaf weight, however 5% level of significance ($P < 0.05$) was observed between 30th - 45th day.

The paired 't' test analysis of mean leaf weight (g/plant) between the control and treatment further exhibits that 1% level ($P < 0.05$) of significance was achieved in all 15th, 30th and 45th day of infestation.

The results clearly indicate that when the infestation takes place on the 15th day, it leads to alteration in the growth as well as in leaf yield and thereby causing the damage and loss to mulberry plants during the harvest. However, when the infestation occurs in 45th day, it leads to comparatively lesser damage on 60th day harvest, which is found to be less significant.

DISCUSSION

Pest and injury assessment are important from the viewpoint of pest management. In particular, pest management decision is based on economic benefit demand a quantitative measure of pest attack to relate to the increase in yield resulting from pest management. If such decisions are based on economic action threshold, a measure of the pest density or amount of injury is an essential part of the decision making system (Walker, 1992)

Keeping in view, the importance of growth and leaf yield, assessment of the pest damage and its further management decision the present study has been undertaken to evaluate the effect of infestation of mulberry pest, leaf roller (*D. pulverulentalis*) on different growth and yield parameters at different stage of mulberry plants. As the study was aimed to give more detail about yield loss assesment of leaf roller larvae in different days of infestation, the chawky stage 15th day, 30th day and 45th day were selected and analysed.

Only limited studies have been conducted on the impact of insect pest infestation on the growth and leaf yield in mulberry, mainly with reference to mealy bug (Kumar *et al.*, 1994 and Sujatha, 1997). But, similar attempts have so far not been made for other pests of mulberry. However, notable works were already carried out for other agricultural crop pests like Rice leaf roller (Den-Jianguo and Chen-Changming, 1990), Sesamum leaf roller (Rohilla and Singh, 1992), Soybean leaf roller (Rungtiwa-Wangwiggaram and Paitton-Leksawasdi, 1986), Groundnut leaf roller (Aroon-Sottikul, 1989) and so on.

The results of the present study clearly indicate that the infestation taken place as early as in chawky stage (15th day from pruning date) on the apical portion leads to alteration in further growth and leaf yield against the control and late infested plants (30th and 45th days). These observations are similar to that of Reddy and Sum (1991). They determine the economic injury level of the maize stem borer, *Chilo partellus* at three different growth stages i. e. 20, 40 and 60 days old plants and the growth yield data obtained from the infested and the protected plants showed that maximum yield reduction and stalk damage occurred to the 20 days old crop, while there was insignificant larval effect on yield for the 60 day old crop.

Such observations have also been recorded in various crops like wheat (White, 1946), maize (Bardner, 1968), cotton (Karmawati *et al.*, 1989), corn (Pereira and Hellma, 1993) and sorghum (Harvey and Haekerot, 1970).

The reason for reduction in yield loss with advancement in crop stage could be increased toughness of the leaves and stem with age, hence it was difficult for the newly hatched larvae to thrive on them well, whereas early infestation at younger stages enabled the larvae to feed longer, thus resulting in higher damages (Sharma and Sharma, 1987).

The tolerance of the plants to leaf roller larvae began to increase as the plant stage advanced. It was observed from the result that 45 days old potted plants were less infested by leaf roller larvae and significantly lesser than 15 days old plants. Kawai *et al.* (1993) observed that the infestation of *Spodoptera exigua* did not affect the growth of the plants when the larvae were inoculated on large plants, unlike on small plants.

The infestation of leaf roller larvae was found mainly on apical portion of mulberry with the chareeteristic rolled leaf. It was observed in mulberry by Krishnaswamy *et al.*, (1970) that the top

tender portion of the twigs produced more succulent leaves and such leaves were found to be superior to the leaves below.

From the foregoing account, it can be concluded that information on mulberry plants by leaf roller leads to significant decrease in growth and leaf yield of mulberry regardless of the growth stage of the plants starting from 15- days through 45- days though the older plants show significantly higher tolerance to pest attack compared to younger plants. Therefore, it would be advisable to initiate pest control strategies against *D. pulverulentalis* at any growth stage of mulberry upto 45 days though employing such measures right when the plants are as young as 15 days would pay higher dividends.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1998) Ann. Rep. CSR&TI, Mysore. Pp. 40-41.
- AROON-SOTTIKUL (1989) Yield loss of groundnut due to leaf roller caterpillar, *Archips micaceana* (Walker). Bangkok.Pub. P. 92.
- BARDNER, R. (1968) Wheat bulb-fly, *Leptohylemyia coarctata* Fall. and its effect on the growth and yield of wheat. Ann. Appl. Biol. 61: 1-11.
- BIRADHAR, N. (1989) Faunistic study of Arthropodes infesting Mulberry (*Morus* species) and Biology of *Eupracticis fraterna* Moore (Lepidoptera: Lymantridae). M.Sc. Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore. P. 81.
- DEN-JIANGUO & CHEN-CHANGMING (1990) The effect of feeding condition on the growth development and reproduction of rice leaf roller. Acta-phytophylacica-sinica 17 (13): 193-199.
- GEETHA BAI, M. MARIMADIAH, B. NARAYANASWAMY, K.C. & RAJAGOPAL, D. (1997) An outbreak of leaf roller pest, *Diaphania* (= *Margaronia*) *pulverulentalis* (Hampson) on mulberry in Karnataka. Geobios New Reports- 19: 16 (2): 73-79.
- GHOSH, C.C. (1924) Reports by the entomologist Mandalaya, for years ended 30th June, 1922 and 1923, P 1-14 and 1-19.
- HARVEY, T.L. & HACKEROT, H.L. (1970) Chemical control of green bug on sorghum and infestation effects on yield. J. econ. Entomol. 63: 1536-1539
- KARMAWATI, E. SOSROMARSONO, S. SOCHARDJAN, M. MATTJIK, A.A. & RAUP, A. (1989) Economic injury levels of cotton bollworm at Asambagus. Pemberitaan - Penelitian-Industri (Indonesia). 14 (3) : 102-112.
- KAWAI, A. KNASHIO, T. AND KAWAMOTO, K. (1993) Damage potential of *Spodoptera exigua* (Hubner) to welsh onion (*Allium fistulosum*) Bull. Natnl. Res. Inst. Veg. Orn. Plants and Tea. 6. Pp. 137-148.
- KRISHNASWAMY, S. ASAN, M. AND SRIHARAN, T.P. (1970) Studies on the quality of mulberry leaves and silkworm cocoon crop production. Indian J. Seric., 9 (1):11-29.
- KUMAR, P. PRASAD, K.S. KUMAR, V. KATIYAR, R.L. AHSAN, M.M. AND DATTA, R.K. (1994) Integrated Pest Management approach to optimise silk worm cocoon production. Proceeding of the international conference on sericulture. Pp.252-257,
- NAIK, S.L. (1997) Bioecology of thrips infesting Mulberry. M.Sc., Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore, p.77.
- PEREIRA, C.J. AND HELLMAN, J.L. (1993) Economic injury levels for *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on silage corn in Maryland. J. econ. Entomol. 86 (4):1266-1270.
- RAJADURAI, S. MANJUNATH, D. KATIYAR, R.L. PRASAD, K.S. SEN, A.K. SHEKHAR, M.A. AHSAN, M.M. AND DATTA, R.K. (1999). Leaf roller- A serious pest of mulberry. Indian Silk 37(12): 9-11.
- RAJKUMAR, G. AND CHANDRASHEKARA RAO, K. (1992) Quantitative analysis for managerial decision making. Pondicherry University, Pondicherry. Pp. 297-320.
- REDDY, K.V. S. AND SUM, K.O.S. (1991) Determination of economic injury level of stem borer, *Chilo partellus* (Swinhoe) in maize, *Zea mays* L. Insect Sci. Applic. 12 (1\2\3):269-274.

- ROHILLA, H.R. AND SINGH, R. (1992) Evaluation of spray schedule and assesment of yield loss in sesamum caused by sesamum leaf roller, *Antigastra actalaunalis* (D) (Pyralidae: Lepidoptera) Indian J. Ento. 54 (1): 48-53.
- RUNGTIWA-WANGWIGGARAM AND PAITTON-LEKSAWASDI (1986) Injury levels of the Soybean leaf roller, *Lamprosema diemenalis* Guence. Conf. Sci. Tech. of Thailand, Bangkok. Pp. 564-565.
- SENGUPTA, K. KUMAR, B. BAIG, M. AND GOVINDAIAH (1990) Handbook on pest and disease control on pest and disease of mulberry and silkworm, United Nations Economic and Social Commission (UNESCO) for Asia and Pecific, Thailand.
- SHARMA, N. AND SHARMA, V.K. (1987) Studies on the economic injury level in maize, *Zea mays* L. to stemborer, *Chilo partellus* (Swinhoe) (Pyralidae: Lepidoptera) in India. Trop.Pest Manage. 33: 44-51.
- SIDDEGOWDA, D.K. GUPTA, V.K. SEN, A.K. BENCHAMIN, K.V. MANJUNATH, D. PRASAD, K.S. MAGDUM, S.B. AND DATTA, R.K. (1995) *Diaphania* species infests mulberry in South India. Indian Silk 34 (12): 6-8.
- SUJATHA, C.R. (1997) Screening of improved mulberry varieties for their susceptibility to mealybug attack and changes in certain qualitative parameters . M.Sc., thesis, University of Mysore, Mysore. Pp. 9-12.
- WALKER, P.T. (1992) Measurement of insect pest populations and injury. In "Crop loss assessment and management " Edited by P.S. Teng. Int. Book. Distco. Lucknow. P.19-29.
- WHITE, R.M. (1946) Preliminary observations on some effect of artificial defoliation of wheat plants. Sci. Agric. 26: 225-229.

IMPACT DE L'INFESTATION PAR L'ENROULEUR DE LA FEUILLE, *DIAPHANIA PULVERULENTALIS* (HAMPSON) (LEPIDOPTERA : PYRALIDAE) SUR LA CROISSANCE ET LE RENDEMENT DU MURIER

S. RAJADURAI, M. MAHENDRA, R. L. KATIYAR* & VINEET KUMAR

Pest Management Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute,
Mysore – 570 008, Karnataka, Inde.

L'enrouleur de la feuille, Diaphania pulverulentalis est un des parasites majeurs dans les plantations de mûriers des états séréricoles du sud de l'Inde. En raison de l'importance économique de ce parasite, nous avons entrepris des études sur la croissance et la perte de rendement foliaire du mûrier en fonction de l'âge du plant, suite à l'infestation des plants par le parasite. Les résultats de cette étude indiquent clairement que l'infestation qui se produit sur la partie apicale quand le plant est jeune (15 jours après la taille) entraîne l'altération de la croissance et du rendement foliaire ultérieurs par rapport au témoin et aux plants infestés plus tardivement (30^{ème} et 45^{ème} jour). La tolérance des plants aux larves de l'enrouleur de la feuille augmente au fur et à mesure de l'avancée en âge du plant comme le prouvent les résultats qui montrent que les plants en pot de 45 jours sont moins infestés par l'enrouleur de la feuille que les plants de 15 jours.

INTRODUCTION

Les plantes sont utilisées par les insectes pour en tirer des nutriments ou un abri. Elles doivent subir des lésions pour répondre aux besoins des insectes. De telles lésions des plantes par les insectes se traduisent par des pertes économiques pour les cultivateurs. L'étendue des dégâts engendrés par les insectes dépend de nombreux facteurs tels que : i) le stade ou la partie de la plante abîmée, ii) la sensibilité de la plante à l'attaque de l'insecte et iii) la nature de la lésion infligée par l'insecte (Ghosh, 1924).

Le mûrier (espèce *Morus*) est la seule plante hôte du ver à soie *Bombyx mori* L. C'est une culture vivace cultivée dans tous les types de sol avec ou sans irrigation. Il est soumis à des dégradations de la part de divers organismes en raison de sa croissance rapide, de l'abondance de son feuillage vert toute l'année. Jusqu'à présent, on sait que le mûrier héberge plus de 300 espèces (insectes et non insectes) à des intensités variées pendant les différentes étapes de culture et saisons (Naik, 1997).

La composition des espèces des différents arthropodes qui infestent le mûrier et leurs effets varient selon les conditions agro-climatiques, la diversité et le mode de culture. Les principales espèces d'insectes qui infligent des dégâts chez le mûrier appartiennent à l'ordre des Lépidoptères, des Hémiptères, des Coléoptères, des Thysanoptères, des Orthoptères et des Isoptères (Biradar, 1989). Dans une étude précédente, Kumar et coll., (1994) ont rapporté que les sériculteurs subissent une perte de rendement en mûriers de l'ordre de 4 500 kg / ha / année à cause de l'infestation par la cochenille *Maconellicoccus hirsutus*.

* Research Extension Centre, Sub-unit, Aurangabad, Maharashtra, Inde.

Depuis 1995, on a enregistré un nouveau parasite appelé l'enrouleur de la feuille, *Diaphania pulverulentalis*, qui infeste le mûrier principalement dans les états du sud producteurs de soie du Karnataka, de l'Andhra Pradesh et du Tamil Nadu (Siddegowda et coll., 1995 ; Geetha Bai et coll., 1997 et Rajadurai et coll., 1999). Compte tenu de la perte de rendement considérable que cela entraîne (12,18 %) et du fait que l'infestation par le parasite entraîne des dégâts sur le plan économique pendant le pic de l'incidence (Rajadurai et coll., 1999), le *Central Sericultural Research and Training Institute* de Mysore a mis au point un Ensemble de Gestion Intégrée du parasite pour lutter efficacement contre le parasite en temps voulu.

L'endroit cible de l'infestation par l'enrouleur de la feuille est la partie apicale de la pousse de mûrier. Les symptômes typiques de l'enrouleur de la feuille sont l'agglomération des feuilles tendres entre elles à cause d'une sécrétion salivaire soyeuse et le fait que les larves restent à l'intérieur des feuilles agglomérées. Lorsque les larves s'abritent à l'intérieur des feuilles agglomérées, elles commencent par dévorer les tissus verts tendres puis elles abiment la pousse apicale, ce qui entraîne son dessèchement et l'arrêt de la croissance du plant. Le cycle de vie de *D. pulverulentalis* est comparativement plus court que celui des autres parasites lépidoptères du mûrier (il est compris entre 17 et 24 jours). En conséquence, le parasite achève 8 à 10 générations au cours de sa période de présence dans les mûraies.

Jusqu'à présent, aucune étude systématique n'a été entreprise sur la croissance et la perte de rendement foliaire chez le mûrier en fonction de l'âge du plant, suite à l'infestation des plants par le parasite en question. Cette étude a donc été réalisée avec les objectifs suivants : i) étudier l'impact de l'infestation par le parasite sur la croissance du plant en fonction de l'âge du plant et ii) évaluer la perte de rendement foliaire provoquée par l'attaque du parasite chez des plants d'âges différents.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée en utilisant des plants de mûrier en pots dans une serre. Elle a débuté en juin 1999 et s'est achevée en février 2000. Nous avons maintenu trois répétitions pour le témoin et le traitement avec 15 mûriers par répétition. La température et l'humidité relative dans des conditions de culture en serre sont comprises respectivement entre 23 et 28° C et entre 70 et 85 %, pendant la période d'expérimentation.

L'élevage de l'enrouleur de la feuille est réalisé en laboratoire en suivant les méthodes d'une personne anonyme (1998). Les larves sont élevées sur les feuilles de la variété de mûrier M-5 dans des récipients en plastique transparent (capacité de 1,5 litre) avec des grilles comme couvercles pour la ventilation. On conserve les papillons adultes en les plaçant dans des cages en bois pour la ponte. On les nourrit avec une solution de saccharose à 10 % et on introduit des pousses de mûrier apicales disposées dans des bocaux coniques remplis d'eau pour leur permettre de pondre. Les larves du 1^{er} âge de l'enrouleur de la feuille sont utilisées pour étudier les effets de l'infestation par le parasite sur la baisse de rendement foliaire des plants de mûrier en pot. On introduit deux larves sur chacune des pousses apicales pour simuler les conditions naturelles.

Les plants en pots sont taillés à la base et on les conserve pour l'expérience. Au bout de 15 jours, les larves du premier âge de l'enrouleur de la feuille sont introduites sur les plants d'expérimentation (15). Les introductions suivantes de larves sont réalisées sur des plants de 30 et 45 jours. On procède aux observations et au recueil des données chez les plants témoins et expérimentaux. On enregistre les données pour les paramètres suivants : i) nombre de feuilles / plant, ii) longueur de la pousse et iii) poids de la feuille fraîche. D'après les données obtenues sur les paramètres ci-dessus, on calcule la baisse de croissance et la perte de rendement foliaire des plants infestés par rapport aux plants témoins. Tous les plants expérimentaux et témoins sont placés séparément derrière des barrières et un tunnel en filet de nylon pour empêcher que les larves de l'enrouleur de la feuille ne s'échappent des plants expérimentaux et éviter les attaques des plants par d'autres parasites.

Les données recueillies pour les témoins et les traitements (infestation le 15^{ème}, le 30^{ème} et le 45^{ème} jour) sont utilisées pour calculer la perte de rendement foliaire en % due aux attaques par les larves de l'enrouleur de la feuille d'après la formule suivante :

Perte de rendement foliaire (%) =

$$\frac{\text{Rendement foliaire des plants témoins} - \text{Rendement foliaire des plants traités}}{\text{Rendement foliaire des plants témoins}} \times 100$$

Les résultats de cette étude sont soumis à une analyse statistique d'après le test "t" selon Rajkumart et Chandrashekara Rao (1992).

RESULTATS

Effet de l'infestation par l'enrouleur de la feuille chez le mûrier à différents stades de croissance :

Les résultats concernant l'effet de l'infestation par l'enrouleur de la feuille sur les paramètres de croissance comme la longueur de la pousse et le nombre de feuilles / plant chez les plants de mûrier en pot d'âges différents (15, 30 et 45 jours) sont présentés dans la Fig. 1. La longueur moyenne de la pousse chez les plants traités et témoins indique que l'influence de l'infestation sur la croissance de la pousse est plus prononcée quand l'infestation se produit chez des plants de 15 jours ($33,53 \pm 5,17$ cm) que chez des plants de 30 jours ($48,33 \pm 8,47$ cm) et de 45 jours ($57,8 \pm 9,84$ cm). La longueur de pousse chez les plants témoins est de $60,47 \pm 10,40$ cm.

On observe une tendance similaire pour les résultats concernant le nombre moyen de feuilles par plant. Les valeurs pour ce paramètre pour des plants de 15, 30 et 45 jours sont respectivement de $26,6 \pm 4,37$; $31,4 \pm 4,5$ et $32,87 \pm 5,04$. Chez le témoin, le nombre moyen de feuilles par plant est de $36,2 \pm 4,63$ (Fig. 1).

Le test "t" révèle qu'au seuil de 1 % ($P < 0,01$) les résultats sont significativement différents entre les trois stades de traitement (15^{ème}, 30^{ème} et 45^{ème} jour) pour la longueur moyenne de la pousse (cm). D'autre part, on observe une différence significative au seuil de 1 % ($P < 0,01$) entre le 15^{ème} et le 30^{ème} jour et entre le 15^{ème} et le 45^{ème} jour tandis que la différence est significative au seuil de 5 % ($P < 0,05$) entre le 30^{ème} et le 45^{ème} jour. Les résultats du test "t" indiquent qu'on atteint une différence significative au seuil de 1 % ($P < 0,01$) pour la longueur moyenne de la pousse (cm) entre les témoins et les traitements pour le 15^{ème} et le 30^{ème} jour tandis que pour le 45^{ème} jour le seuil est de 5 % ($P < 0,05$) entre le témoin et le traitement.

Effet de l'infestation par l'enrouleur de la feuille sur le rendement foliaire du mûrier à différents stades de croissance :

Les résultats concernant les paramètres de rendement foliaire comme le poids de la feuille et la perte de rendement foliaire des plants de mûrier en pots ayant été infestés par les larves de l'enrouleur de la feuille les 15^{ème}, 30^{ème} et 45^{ème} jours et pour les témoins sont présentés respectivement dans la Fig. 1 et le Tableau I.

Le poids moyen de la feuille (g / plant) est plus faible chez les plants infestés le 15^{ème} jour ($32,73 \pm 7,31$) que chez les plants infestés le 30^{ème} jour ($38,63 \pm 6,73$) et le 45^{ème} jour ($40,13 \pm 8,14$) tandis qu'il est beaucoup plus élevé chez les plants témoins en pots ($50,22 \pm 9,65$). Les résultats présentés dans le Tableau I soulignent que la perte de rendement foliaire (%) est maximum le 15^{ème} jour ($34,83$) plus que le 30^{ème} ($25,68$) et le 45^{ème} jour ($20,09$). L'analyse statistique avec le test "t" montre qu'on obtient une différence significative au seuil de 1 % ($P < 0,01$) entre les traitements c'est à dire entre le 15^{ème} et le 30^{ème} jour et entre le 15^{ème} et le 45^{ème} jour pour le poids foliaire moyen, cependant on observe une différence au seuil de 5 % ($P < 0,05$) entre le 30^{ème} et le 45^{ème} jour.

L'analyse avec le test "t" pour le poids moyen de la feuille (g / plant) entre le témoin et le traitement montre encore qu'on obtient une différence significative au seuil de 1 % ($P < 0,05$) entre une infestation ayant lieu le 15^{ème}, le 30^{ème} et le 45^{ème} jour.

D'après les résultats il est clair que quand l'infestation a lieu le 15^{ème} jour, elle altère la croissance et le rendement foliaire, et de ce fait entraîne des dégâts et des pertes de mûriers au cours de la récolte. Par contre, quand l'infestation se produit le 45^{ème} jour, elle entraîne des dégâts comparativement moins importants lors de la récolte le 60^{ème} jour.

DISCUSSION

L'évaluation des parasites et des lésions est importante dans la lutte contre les parasites. En particulier, la décision de lutte contre le parasite se base sur le rapport économique et il est nécessaire de mesurer quantitativement l'attaque par le parasite pour évaluer l'augmentation de rendement résultant de la lutte contre le parasite. Si de telles décisions se basent sur un seuil d'action économique, la mesure de la densité de parasites ou de la quantité de lésions fait intégralement partie du processus de décision (Walker, 1992).

Compte tenu de l'importance de la croissance et du rendement foliaire, de l'évaluation des dégâts causés par le parasite et de la décision ultérieure de lutte qui s'ensuit, nous avons entrepris cette étude pour évaluer l'effet de l'infestation par le parasite du mûrier, l'enrouleur de la feuille (*D. pulverulentalis*), sur les différents paramètres de croissance et de rendement à différents stades chez les plants de mûrier. Comme l'objectif de l'étude est de donner plus de détails sur l'évaluation de la perte de rendement provenant d'infestations par les larves de l'enrouleur de la feuille survenues à des jours différents, nous avons sélectionné et analysé le 15^{ème} jour, le 30^{ème} jour, et le 45^{ème} jour.

Les études qui ont été réalisées sur l'impact de l'infestation par les parasites par rapport à la croissance et au rendement foliaire du mûrier sont limitées et concernent surtout la cochenille (Kumar et coll., 1994 et Sujatha, 1997) mais, jusqu'à présent, aucun essai similaire n'a été réalisé chez d'autres parasites du mûrier. Cependant, des études remarquables ont déjà été réalisées chez d'autres parasites des cultures agricoles comme l'enrouleur de la feuille du riz (Den-Jianguo et Chen-Changming, 1990), l'enrouleur de la feuille du sésame (Rohilla et Singh, 1992), l'enrouleur de la feuille du soja (Rungtiwa – Wangwiggaram et Paitton-Leksawasdi, 1986) et l'enrouleur de la feuille de l'arachide (Aroon-Sottikul, 1989).

Les résultats de cette étude indiquent clairement que, l'infestation qui a lieu à un stade aussi précoce que le stade "chawki" (15^{ème} jour à partir de la taille) sur la partie apicale, entraîne l'altération de la croissance et du rendement foliaire les plus importants par rapport au témoin et aux plants infestés tardivement (30^{ème} et 45^{ème} jours). Ces observations sont similaires à celles de Reddy et Sum (1991). Ils ont observé des dégâts sur le plan économique à trois stades différents de croissance, c'est à dire chez des plants de 20, 40 et 60 jours avec le perceur de la tige de maïs, *Chilo partellus* et les données sur le rendement et la croissance des plants infestés et protégés montrent que la diminution de rendement et les dégâts sur le pédoncule sont maximum chez les plants de 20 jours tandis qu'il y a un effet insignifiant sur le rendement chez les plants de 60 jours.

De telles observations ont aussi été enregistrées pour des cultures variées comme le blé (White, 1946), le maïs (Bardner, 1968), le coton (Karmawati et coll., 1989), le grain (Pereira et Hellma, 1993) et le sorgho (Harvey et Hackerot, 1970).

La dureté des feuilles et de la tige augmentent avec l'âge et de ce fait il est donc difficile pour les larves nouvellement écloses de s'épanouir, ce qui pourrait expliquer que la perte de rendement est inférieure au fur et à mesure de la croissance de la culture tandis qu'une infestation précoce aux stades plus jeunes permet aux larves de se nourrir plus longtemps, ce qui entraîne des dégâts plus importants (Sharma et Sharma, 1987).

Les plants tolèrent de plus en plus les larves de l'enrouleur de la feuille au fur et à mesure de l'avancée en âge de la plante. D'après les résultats, on observe que les plants en pots de 45 jours sont

beaucoup moins infestés par les larves de l'enrouleur de la feuille que les plants de 15 jours. Kawai et coll., (1993) ont observé que l'infestation par *Spodoptera exigua* n'a pas d'effet sur la croissance des plants quand on inocule les larves sur des grands plants à l'inverse des petits plants.

On constate que l'infestation par les larves de l'enrouleur de la feuille se produit principalement sur la partie apicale du mûrier avec un enroulement caractéristique de la feuille. Krishnaswamy et coll., (1970) ont observé que la partie supérieure et tendre des petites branches du mûrier produit des feuilles plus succulentes et ils ont constaté que ces feuilles sont toujours supérieures aux feuilles inférieures.

D'après ce rapport, on peut conclure que l'enrouleur de la feuille entraîne une baisse significative de la croissance et du rendement foliaire chez le mûrier quel que soit le stade de croissance des plants entre 15 et 45 jours bien que les plants plus âgés présentent une tolérance significativement plus élevée à l'attaque par les parasites par comparaison aux plants plus jeunes. On conseille donc de commencer des stratégies de lutte contre le parasite *D. pulverulentalis* à n'importe quel stade de croissance du mûrier jusqu'à 45 jours, bien que si l'on applique ces mesures quand les plants n'ont que 15 jours, elles donnent de meilleurs résultats.

BIOCHEMICAL RESPONSES OF MULBERRY GENOTYPES TO NaCl SALINITY

S. SHAIK MOHAMED ANAS¹ AND M. VIVEKANANDAN²

1. International Centre for Water and Energy Systems, P.O. Box 2623, Abu Dhabi, United Arab Emirates

2. Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirapalli – 620 024, Tamil Nadu, India

Five different mulberry genotypes (Tr4, Tr10, Mysore Local, MR2 *Morus indica* and Kosen *Morus latifolia*) were grown in solution cultures containing different concentrations of NaCl (0, 10, 20, and 30 mM) whose EC values ranged from 0.52 to 4.60 mS cm⁻¹ with a pH value of 7.0 for critical analysis of pigment composition, biochemical constituents, nitrogenous compounds and photosynthetic CO₂ uptake in response to NaCl salinity. Chloroplast pigments, which are widely used as markers for saline tolerance, increased significantly in both Tr4 and Tr10 genotypes. Regarding the biochemical constituents, total soluble sugars coupled with β -carotene and ascorbic acid were relatively higher in the leaves of Tr4 and Tr10. In the case of root in Tr4 and Tr10 total soluble sugars, ascorbic acid and total phenols were higher than any other genotype possibly indicating saline tolerance nature of Tr4 and Tr10. It became evident that Tr4 and Tr10 have the potency to perform nitrogen metabolism comparatively in a better way than the rest of the genotypes as is evident on the basis of the marginal increase in total nitrogen, nitrate and nitrite contents supported by increased levels of total nitrogen, nitrate and nitrite in roots as well. Salinity did not affect the photosynthetic CO₂ uptake in all the genotypes particularly in Tr4 and Tr10.

Keywords: Sodium chloride, hydroponics, mulberry, saline tolerance.

INTRODUCTION

Salinity is a wide spread problem in arid and semi-arid regions causing a significant decrease in agricultural productivity. About 25% of the world's cultivated land is reported to be saline (Chowdhury *et al.*, 1993). In India, the salt-affected area is about 7.0 million hectares, out of which 2.1 million hectares comprise saline soils in the coastal tracts (Yadav *et al.*, 1979). Salinity limits crop yields on nearly one third of the world's irrigated land and salinization continues to increase worldwide (Johnson *et al.*, 1992). Reclamation, drainage and improved irrigation practices might reduce the severity and spread of salinization in some regions, but costs of these practices are generally prohibitive particularly in developing countries like India. A relatively low-cost, short-term solution may be the development of genotypes that are tolerant to low or moderate levels of salinity. In mulberry gardens of tropical and sub-tropical regions, annual rainfall is often insufficient to flush out accumulated salts from the root zone.

In India, sericulture (rearing of silkworms by using mulberry leaves) has become the means of livelihood for more than six million people in over 52000 villages. The mulberry is a tree of great value in the sericulture industry and is widely advocated for extensive cultivation in Tamil Nadu to boost silk production. Mulberry leaves are the only food plants of the monophagus silkworm (*Bombyx mori* L.). Although attempts have been made to identify suitable mulberry genotypes for rainfed

conditions (Susheelamma *et al.*, 1990; Dorcus, 1995), relatively little or no work has been done on salinity (Ramanjulu *et al.*, 1994; Shaik Mohamed Anas and Vivekanandan, 1994, 1999, 2000a and 2000b). Therefore, the present study was undertaken; five different mulberry genotypes (Tr4, Tr10, Mysore Local, Kosen and MR2) were grown hydroponically at various concentrations of NaCl to understand the direct effects of salinity on the mulberry. Pigment composition, biochemical constituents, nitrogenous compounds, and photosynthetic CO₂ uptake were assessed to determine their inherent potential for growth in saline soil. The present study deals with NaCl salinity as this is one of the prominent salts in most of the saline belts in and around Tamil Nadu. In most of the screening programmes on salinity, NaCl is used as the selection agent (Chowdhury *et al.*, 1993) as it may help in identification of genotypes resistant to salt and ionic stress.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted during 1996-97 in the laboratory of Biotechnology, School of Life Sciences (Sericulture), Bharathidasan University, Tamil Nadu, India. Cuttings of five different mulberry genotypes (Tr4, Tr10, Mysore Local, Kosen and MR2) collected from the mulberry garden of the Bharathidasan University of 15 cm length with 4 to 5 live buds (Krishnaswamy, 1978) were planted in plastic culture trays (45 x 30 x 9 cm). Twenty-five cuttings are inserted in a plastic culture tray covered with perforated thermacole sheet for each concentration of NaCl treatment. The basal 'chisel' (a tool with a long metal blade that has a sharp edge for cutting wood) cut end of the cuttings was dipped into the experimental solution. Three separate culture trays having 25 cuttings were used for each concentration of NaCl treatment for replication. The standard culture solution was prepared following the method of Hewitt (1966). NaCl was added immediately to give final concentrations of 10, 20 and 30 mM, and solution pH was adjusted to 7.0 with 0.1N NaOH. Electrical conductivity of the solutions was 2.70, 3.90 and 4.60 mS cm⁻¹ respectively. The base nutrient solution served as the control (0.52 mS cm⁻¹). The culture solution was changed at 3-day intervals. The cuttings were raised in laboratory under natural white light intensity up to 600 µE m⁻² s⁻¹ at 30±1°C temperature and a relative humidity of about 60±5%. Sixty days old saplings were carefully removed from the culture trays and both leaves and roots were washed with distilled water and used for the biochemical analysis. Chloroplast pigments and carotenoids were analysed following the methods of Arnon (1949) and Goodwin (1954) respectively. Chlorophyll stability index (CSI) was determined by the method of Murty and Majumdar (1962). Total soluble protein was assayed by the method of Lowry *et al.* (1951). Total soluble sugars and total free amino acids were determined following the methods of Dubois *et al.* (1956) and Troll and Canon (1953) respectively. Total phenols, total soluble starch, sucrose, sterols, β-carotene, ascorbic acid, total lipids, were estimated by the methods of Swain and Hillies (1959), McCready *et al.* (1950), Van Handel (1968), King and Wooten (1959), Goodwin (1954), Barakat *et al.* (1973), Bragdon (1951) respectively. Total nitrogen content was estimated by the modified microkjeldahl method of Umbreit *et al.* (1972). Nitrate and nitrite contents were estimated as outlined by Wolley *et al.* (1960). All the analyses were carried out at least in triplicate from 3 sets of independent experiments. The data collected during the period of this study were subjected to statistical analysis (Standard Deviation and Standard Error) by adopting standard procedures described by Zar (1974).

RESULTS

Analysis of chloroplast pigments for all the five genotypes is given in Table 1. In Tr4 and Tr10, salinity did not have any detrimental effect on chlorophylls 'a' and 'b' as well as carotenoids. In fact, there was a tremendous increase in the content of chlorophyll a (even upto two-fold) in Tr4. In Mysore Local, the levels of chlorophyll 'a', 'b' and carotenoids were hardly found to be affected. In Kosen and MR2 chlorophyll 'a' was found to be affected from about 30 to 35 per cent at 20 to 30 mM NaCl.

whereas in chlorophyll 'b' the reduction was found between about 35 and 42 percent at 30 mM NaCl. In Kosen, carotenoids were hardly found to be affected and in MR2 at 30 mM NaCl about 25 percent of carotenoids were found to be reduced.

Table I. Effect of NaCl salinity on chloroplast pigments of five different mulberry genotypes. The saplings were grown in different concentrations of NaCl (0 to 30 mM) in hydroponics at a pH of 7.0 at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. The leaves of the 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau I. Effet de la salinité NaCl sur les pigments du chloroplaste de cinq géotypes de mûrier différents. Les plantons sont cultivés avec différentes concentrations de NaCl (0 à 30 mM) dans des cultures hydroponiques avec un pH de 7,0 à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les feuilles des plantons âgés de 60 jours sont utilisées pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (Poids sec).

Mulberry genotypes	NaCl Concentrations (mM)	Chl a	Chl b	Total carotenoids	SDm	SEm
Géotypes de mûrier	Concentrations en NaCl (mM)	Caroténoïdes totaux				
Tr4	0	0.45 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.02	0.02	0.01
	10	0.82 $\pm$ 0.05 (182.22)	0.68 $\pm$ 0.05 (161.90)	0.52 $\pm$ 0.04 (152.94)	0.04	0.01
	20	0.96 $\pm$ 0.07 (213.33)	0.74 $\pm$ 0.06 (176.19)	0.56 $\pm$ 0.05 (164.70)	0.06	0.02
	30	0.99 $\pm$ 0.07 (220.00)	0.83 $\pm$ 0.07 (197.62)	0.59 $\pm$ 0.04 (173.53)	0.06	0.02
Tr10	0	0.68 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.02	0.04	0.01
	10	0.69 $\pm$ 0.05 (101.47)	0.52 $\pm$ 0.04 (101.96)	0.56 $\pm$ 0.04 (116.67)	0.04	0.01
	20	0.84 $\pm$ 0.05 (123.53)	0.67 $\pm$ 0.06 (131.37)	0.58 $\pm$ 0.03 (120.83)	0.05	0.01
	30	0.94 $\pm$ 0.08 (138.23)	0.72 $\pm$ 0.06 (141.18)	0.62 $\pm$ 0.02 (129.17)	0.05	0.01
Mysore Local	0	1.14 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.03	0.06	0.02
	10	1.12 $\pm$ 0.10 (98.24)	1.01 $\pm$ 0.10 (101.00)	0.64 $\pm$ 0.03 (94.12)	0.08	0.02
	20	1.11 $\pm$ 0.09 (97.37)	0.98 $\pm$ 0.04 (98.00)	0.64 $\pm$ 0.02 (94.12)	0.05	0.01
	30	1.09 $\pm$ 0.04 (95.61)	0.97 $\pm$ 0.03 (97.00)	0.60 $\pm$ 0.04 (88.23)	0.04	0.01
Kosen	0	0.39 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.03	0.02	0.01
	10	0.32 $\pm$ 0.02 (82.05)	0.30 $\pm$ 0.02 (88.23)	0.40 $\pm$ 0.02 (95.24)	0.02	0.01
	20	0.28 $\pm$ 0.01 (93.33)	0.20 $\pm$ 0.01 (58.82)	0.40 $\pm$ 0.05 (95.24)	0.02	0.01
	30	0.25 $\pm$ 0.02 (64.10)	0.20 $\pm$ 0.01 (58.82)	0.40 $\pm$ 0.02 (95.24)	0.02	0.01
MR2	0	0.75 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.02	0.04	0.01
	10	0.74 $\pm$ 0.05 (98.67)	0.66 $\pm$ 0.05 (101.54)	0.36 $\pm$ 0.01 (94.74)	0.04	0.01
	20	0.70 $\pm$ 0.04 (93.33)	0.64 $\pm$ 0.04 (98.46)	0.36 $\pm$ 0.02 (94.74)	0.03	0.01
	30	0.54 $\pm$ 0.04 (72.00)	0.43 $\pm$ 0.02 (66.15)	0.29 $\pm$ 0.01 (76.31)	0.02	0.01

Since the levels of chlorophylls 'a' and 'b' were not affected at all in both Tr4 and Tr10, and in fact, increment in their levels were observed, it was logical to work out chlorophyll stability index (CSI) (Murty and Majumdar 1962). In Tr4 and Tr10, the CSI was always found to be higher than the CSI at 0 mM NaCl, whereas in all other cases the CSI was found to be significantly reduced at 30 mM NaCl by several-fold, compared to Tr4 and Tr10 (Fig. 1).

In order to find out the effect of salinity on various biomolecules in leaves, their levels were determined in different mulberry genotypes as given in Tables II to VI. Of all chemical substances, total soluble sugars increased to a considerable level (56 to 66%) in Tr4 and Tr10 but in Mysore Local, a significant reduction occurred at increasing salinity (~ 66%). In Kosen, the increase in sugar content was almost doubled by salinity, whereas in MR2 no such effect was observed at any concentration of NaCl. In some mulberry genotypes like Tr4, Tr10 increase in free amino acid content was observed in other genotypes, the level of free amino acids was not found to vary, whereas in Mysore Local the level was reduced by 40 per cent at 30 mM NaCl. Total phenols in the Tr4 and Tr10 genotypes were found to increase quite considerably, whereas in all other genotypes marginal to significant reduction was observed. Total sterols were reduced significantly in all the genotypes.

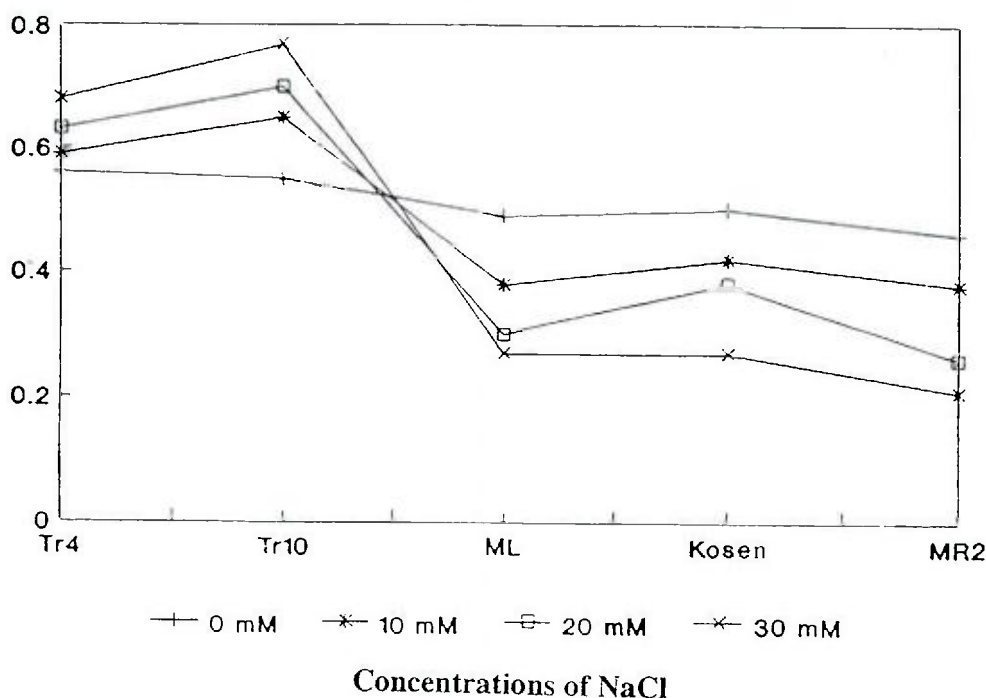


Fig. 1. Chlorophyll stability index (CSI) of 60-day old mulberry genotypes grown separately in different concentrations of NaCl (0 to 30 mM) in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ \text{C}$). The data are the mean of three different experiments with SEM of ± 0.005 .

Fig. 1. Indice de stabilité de la chlorophylle (CSI) de génotypes de mûrier âgés de 60 jours cultivés avec différentes concentrations de NaCl (0 à 30 mM) dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ \text{C}$). Les données sont la moyenne de trois expériences différentes avec un intervalle de confiance de la moyenne de $\pm 0,005$.

Table II. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of leaves of Tr4 mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau II. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des feuilles du génotype de mûrier Tr4. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. On utilise des plantons de 60 jours pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs du témoin. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines solubles totales</i>	20.10 ± 1.5	17.81 ± 1.0 (88.61)	17.00 ± 1.6 (84.58)	15.00 ± 1.0 (74.53)	1.28	0.48
Total free amino acids <i>Acides aminés libres totaux</i>	27.85 ± 1.0	34.65 ± 2.3 (124.42)	39.40 ± 2.1 (141.47)	39.50 ± 2.2 (141.83)	1.90	0.62
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	40.00 ± 2.7	60.00 ± 3.1 (150.00)	62.50 ± 3.2 (156.25)	62.50 ± 3.0 (156.25)	3.00	1.10
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	28.50 ± 1.2	26.75 ± 1.1 (93.86)	25.50 ± 1.3 (89.47)	20.00 ± 1.2 (70.17)	1.20	0.39
Sucrose <i>Saccharose</i>	2.75 ± 0.12	1.90 ± 0.10 (69.09)	1.65 ± 0.10 (60.00)	1.35 ± 0.10 (49.09)	0.10	0.02
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	1.20 ± 0.10	1.30 ± 0.10 (108.33)	1.60 ± 0.11 (133.33)	1.80 ± 0.13 (150.00)	0.11	0.04
Total sterols <i>Stérols totaux</i>	3.90 ± 0.32	1.90 ± 0.10 (48.72)	1.70 ± 0.10 (43.59)	0.90 ± 0.07 (23.08)	0.15	0.40
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	27.30 ± 1.8	17.50 ± 1.4 (64.10)	16.50 ± 1.5 (60.44)	14.70 ± 1.2 (53.85)	1.47	0.48
β -Carotene	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01 (100.00)	0.04 ± 0.01 (133.33)	0.04 ± 0.01 (133.33)	0.01	0.002
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	6.62 ± 0.38	9.31 ± 0.41 (140.63)	9.54 ± 0.40 (144.11)	9.99 ± 0.42 (150.91)	0.40	0.12

Table III. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of leaves of Tr10 mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau III. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des feuilles du génotype de mûrier Tr10. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les plantons de 60 jours sont utilisés pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (Poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines solubles totales</i>	20.10 ± 1.0	20.00 ± 1.1 (100.00)	18.52 ± 0.90 (92.60)	17.51 ± 0.90 (87.55)	0.98	0.32
Total free amino acids <i>Acides aminés libres totaux</i>	20.55 ± 1.0	24.50 ± 1.4 (119.22)	25.60 ± 1.4 (148.15)	25.61 ± 1.5 (166.67)	1.32	0.44
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	40.50 ± 1.2	55.00 ± 1.5 (135.80)	60.00 ± 1.7 (148.15)	67.50 ± 1.6 (66.67)	1.50	0.47
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	26.75 ± 1.4	24.50 ± 1.2 (91.59)	23.50 ± 1.3 (87.85)	21.00 ± 1.4 (78.50)	1.32	0.42
Sucrose <i>Saccharose</i>	1.90 ± 0.10	1.55 ± 0.10 (81.58)	1.40 ± 0.11 (73.68)	1.25 ± 0.10 (65.79)	0.10	0.02
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	1.10 ± 0.10	1.25 ± 0.10 (113.64)	1.70 ± 0.11 (154.54)	1.95 ± 0.10 (177.27)	0.10	0.03
Total sterols <i>Stérols totaux</i>	3.75 ± 0.25	1.80 ± 0.10 (48.00)	1.05 ± 0.06 (28.00)	0.95 ± 0.05 (25.33)	0.11	0.04
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	25.30 ± 1.2	16.90 ± 1.0 (66.80)	16.50 ± 1.0 (65.22)	14.60 ± 0.82 (57.71)	1.00	0.32
β -Carotene	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01 (200.00)	0.06 ± 0.01 (300.00)	0.09 ± 0.02 (450.00)	0.01	0.004
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	4.99 ± 0.41	6.24 ± 0.41 (125.05)	6.42 ± 0.40 (128.66)	6.68 ± 0.41 (133.87)	0.41	0.14

Table IV. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of leaves of Mysore Local mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau IV. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des feuilles du génotype de mûrier Mysore local. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les plantons de 60 jours sont utilisés pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble protéins <i>Protéines solubles totales</i>	22.53 $\pm$ 1.0	21.00 $\pm$ 1.1 (93.21)	20.00 $\pm$ 1.0 (88.77)	14.95 $\pm$ 1.0 (66.35)	1.02	0.32
Total free amino acids <i>Acides aminés totaux libres</i>	38.72 $\pm$ 1.9	33.51 $\pm$ 1.2 (86.54)	33.00 $\pm$ 1.0 (85.23)	24.00 $\pm$ 1.0 (61.98)	1.27	0.41
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	75.00 $\pm$ 2.2	65.50 $\pm$ 2.0 (87.33)	35.00 $\pm$ 1.8 (46.67)	25.53 $\pm$ 1.1 (34.04)	1.77	0.59
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	11.10 $\pm$ 0.62	10.30 $\pm$ 0.61 (92.79)	10.30 $\pm$ 0.52 (92.79)	10.00 $\pm$ 0.50 (90.09)	0.56	0.19
Sucrose <i>Saccharose</i>	4.82 $\pm$ 0.32	4.20 $\pm$ 0.20 (87.14)	3.94 $\pm$ 0.21 (81.74)	3.72 $\pm$ 0.20 (77.18)	0.23	0.06
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	1.95 $\pm$ 0.12	1.72 $\pm$ 0.10 (88.20)	1.40 $\pm$ 0.10 (71.79)	1.03 $\pm$ 0.06 (52.82)	0.10	0.02
Total sterols <i>Sterols totaux</i>	3.00 $\pm$ 0.21	2.72 $\pm$ 0.14 (90.67)	2.10 $\pm$ 0.10 (70.00)	1.87 $\pm$ 0.10 (62.33)	0.14	0.04
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	20.51 $\pm$ 1.2	19.72 $\pm$ 1.0 (96.15)	18.23 $\pm$ 1.0 (88.88)	17.00 $\pm$ 1.0 (82.89)	1.05	0.29
β -Carotene	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01 (75.00)	0.02 $\pm$ 0.01 (50.00)	0.02 $\pm$ 0.01 (50.00)	0.01	0.002
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	5.21 $\pm$ 0.42	5.62 $\pm$ 0.38 (107.87)	6.00 $\pm$ 0.71 (115.16)	6.22 $\pm$ 0.75 (119.38)	0.56	0.17

Table V. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of leaves of Kosen mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau V. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des feuilles du génotype de mûrier Kosen. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les plantons de 60 jours sont utilisés pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines solubles totales</i>	24.00 ± 1.2	22.21 ± 1.0 (92.54)	21.25 ± 1.3 (88.54)	20.70 ± 1.2 (86.25)	1.17	0.38
Total free amino acids <i>Acides aminés totaux libres</i>	25.51 ± 1.2	27.80 ± 1.7 (108.98)	30.00 ± 1.9 (117.60)	30.30 ± 2.1 (118.78)	1.72	0.57
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	30.00 ± 2.1	42.50 ± 2.4 (141.67)	60.00 ± 2.0 (200.00)	67.50 ± 2.8 (225.00)	2.32	0.75
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	38.50 ± 2.8	37.60 ± 2.0 (97.66)	37.00 ± 2.7 (96.10)	26.81 ± 2.0 (69.64)	2.37	0.77
Sucrose <i>Saccharose</i>	3.52 ± 0.31	3.06 ± 0.28 (86.93)	2.84 ± 0.21 (80.68)	2.62 ± 0.20 (74.43)	0.25	0.08
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	2.25 ± 0.17	2.10 ± 0.11 (93.33)	2.12 ± 0.10 (88.89)	1.83 ± 0.05 (84.44)	0.13	0.04
Total sterols <i>Stérols totaux</i>	3.51 ± 0.21	2.72 ± 0.14 (77.49)	2.12 ± 0.10 (60.40)	1.83 ± 0.15 (52.14)	0.12	0.03
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	21.32 ± 1.3	20.10 ± 1.0 (94.28)	18.72 ± 1.0 (87.70)	17.31 ± 1.0 (81.19)	1.07	0.33
β -Carotene	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01 (100.00)	0.02 ± 0.01 (66.67)	0.02 ± 0.01 (66.67)	0.01	0.002
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	5.00 ± 0.51	5.23 ± 0.60 (104.60)	5.71 ± 0.52 (114.20)	6.21 ± 0.55 (124.20)	0.54	0.17

Table VI. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of leaves of MR2 mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau VI. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des feuilles du génotype de mûrier MR2. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les plantons de 60 jours sont utilisés pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines totales solubles</i>	18.50 ± 1.0	15.25 ± 1.1 (82.43)	14.25 ± 0.82 (77.03)	12.50 ± 0.72 (67.57)	0.91	0.29
Total free amino acids <i>Acides aminés libres totaux</i>	43.65 ± 2.0	43.00 ± 1.8 (98.51)	42.15 ± 2.1 (96.56)	41.65 ± 1.9 (95.42)	1.95	0.62
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	23.75 ± 1.0	22.00 ± 1.1 (92.63)	21.25 ± 1.0 (89.47)	20.00 ± 1.0 (84.21)	1.02	0.31
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	40.00 ± 2.1	35.50 ± 1.8 (88.75)	24.00 ± 1.2 (60.00)	22.00 ± 1.3 (55.00)	1.60	0.50
Sucrose <i>Saccharose</i>	2.84 ± 0.19	2.21 ± 0.12 (86.93)	1.90 ± 0.10 (80.68)	1.51 ± 0.10 (74.43)	0.13	0.04
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	8.00 ± 0.52	5.70 ± 0.42 (71.25)	5.25 ± 0.41 (65.62)	4.75 ± 0.32 (59.37)	0.42	0.14
Total sterols <i>Stérols totaux</i>	3.34 ± 0.20	2.92 ± 0.15 (87.42)	2.00 ± 0.10 (59.88)	1.52 ± 0.05 (45.51)	0.12	0.03
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	22.51 ± 1.3	21.23 ± 1.0 (94.31)	20.00 ± 1.0 (88.84)	18.32 ± 1.0 (81.39)	1.07	0.36
β -Carotene	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01 (75.00)	0.02 ± 0.01 (75.00)	0.02 ± 0.01 (50.00)	0.01	0.002
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	5.21 ± 0.50	5.40 ± 0.50 (103.65)	5.92 ± 0.51 (113.63)	6.21 ± 0.52 (119.19)	0.51	0.17

Table VII. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of roots of Tr4 mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau VII. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des racines du génotype de mûrier Tr4. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. On utilise des plantons de 60 jours pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines solubles totales</i>	15.50 $\pm$ 1.2	12.70 $\pm$ 1.0 (81.93)	12.20 $\pm$ 1.2 (78.71)	10.00 $\pm$ 0.90 (64.52)	1.07	0.36
Total free amino acids <i>Acides aminés libres totaux</i>	23.11 $\pm$ 1.5	20.50 $\pm$ 1.0 (88.71)	11.50 $\pm$ 1.0 (49.76)	4.70 $\pm$ 0.30 (20.34)	0.95	0.30
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	36.50 $\pm$ 1.3	40.00 $\pm$ 1.2 (109.59)	42.21 $\pm$ 1.0 (115.64)	50.70 $\pm$ 1.5 (138.90)	1.25	0.42
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	4.50 $\pm$ 0.30	2.21 $\pm$ 0.20 (49.11)	2.10 $\pm$ 0.11 (46.67)	2.00 $\pm$ 0.10 (44.44)	0.18	0.05
Sucrose <i>Saccharose</i>	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01 (75.00)	0.03 $\pm$ 0.01 (75.00)	0.02 $\pm$ 0.01 (50.00)	0.01	0.003
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	6.00 $\pm$ 0.41	6.31 $\pm$ 0.40 (105.17)	6.82 $\pm$ 0.30 (113.67)	7.72 $\pm$ 0.42 (128.67)	0.38	0.13
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	47.90 $\pm$ 2.2	40.50 $\pm$ 2.0 (84.55)	35.00 $\pm$ 2.1 (73.07)	29.40 $\pm$ 2.0 (61.38)	2.07	0.68
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	0.79 $\pm$ 0.06	0.82 $\pm$ 0.05 (103.80)	0.94 $\pm$ 0.05 (118.99)	1.15 $\pm$ 0.06 (145.57)	0.05	0.02

Table VIII. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of roots of Tr10 mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau VIII. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des racines du génotype de mûrier Tr10. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les plantons de 60 jours sont utilisés pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % des valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines solubles totales</i>	15.00 ± 0.83	14.90 ± 0.72 (99.33)	13.51 ± 0.51 (90.07)	12.50 ± 0.52 (83.33)	0.64	0.20
Total free amino acids <i>Acides aminés libres totaux</i>	34.61 ± 1.2	30.10 ± 1.1 (86.97)	14.00 ± 0.39 (40.45)	7.00 ± 0.31 (20.22)	0.75	0.21
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	30.20 ± 1.3	40.00 ± 1.0 (132.45)	47.21 ± 1.2 (157.32)	50.00 ± 1.7 (165.56)	1.30	0.43
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	3.60 ± 0.23	2.11 ± 0.12 (58.61)	2.00 ± 0.10 (55.55)	1.90 ± 0.09 (52.78)	0.13	0.03
Sucrose <i>Saccharose</i>	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01 (75.00)	0.03 ± 0.001 (75.00)	0.02 ± 0.001 (50.00)	0.001	0.002
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	6.35 ± 0.41	6.85 ± 0.42 (107.87)	7.20 ± 0.51 (113.38)	7.70 ± 0.50 (121.26)	0.46	0.13
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	46.50 ± 2.0	40.00 ± 2.1 (86.02)	37.00 ± 2.0 (79.57)	29.00 ± 1.8 (62.36)	1.97	0.65
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	0.84 ± 0.04	0.92 ± 0.04 (109.52)	1.00 ± 0.05 (119.05)	1.27 ± 0.05 (151.19)	0.04	0.01

Table IX. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of roots of Mysore Local mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau IX. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des racines du génotype de mûrier local Mysore. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Les plantons de 60 jours sont utilisés pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) mg g^{-1} ps	NaCl Concentrations (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines solubles totaux</i>	14.20 ± 0.73	13.80 ± 0.52 (97.18)	12.41 ± 0.51 (87.39)	11.11 ± 0.50 (78.24)	0.56	0.19
Total free amino acids <i>Acides aminés totaux libres</i>	24.51 ± 0.81	21.40 ± 0.72 (87.31)	17.22 ± 0.42 (70.26)	10.15 ± 0.31 (41.41)	0.56	0.18
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	26.11 ± 0.91	23.20 ± 0.72 (88.85)	19.40 ± 0.41 (74.30)	17.33 ± 0.42 (66.37)	0.64	0.20
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	3.00 ± 0.19	2.40 ± 0.11 (80.00)	1.90 ± 0.12 (63.33)	1.22 ± 0.06 (40.67)	0.28	0.08
Sucrose <i>Saccharose</i>	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01 (66.67)	0.02 ± 0.01 (66.67)	0.01 ± 0.001 (33.33)	0.01	0.002
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	4.21 ± 0.30	3.92 ± 0.21 (93.82)	2.73 ± 0.20 (64.84)	2.11 ± 0.10 (50.12)	0.20	0.05
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	40.50 ± 2.0	37.31 ± 2.0 (92.12)	35.00 ± 2.0 (86.42)	31.52 ± 2.2 (77.83)	2.07	0.67
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	0.69 ± 0.03	0.52 ± 0.02 (75.36)	0.50 ± 0.02 (72.46)	0.44 ± 0.01 (63.77)	0.02	0.004

Table X. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of roots of Kosen mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau X. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des racines du géotype de mûrier Kosen. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. On utilise des plantons de 60 jours pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM) / Concentrations en NaCl (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines solubles totales</i>	14.90 $\pm$ 0.81	13.11 $\pm$ 0.72 (87.99)	11.70 $\pm$ 0.51 (78.52)	10.41 $\pm$ 0.53 (69.86)	0.64	0.20
Total free amino acids <i>Acides aminés totaux libres</i>	23.80 $\pm$ 1.1	20.71 $\pm$ 1.2 (87.02)	16.50 $\pm$ 1.0 (69.33)	9.41 $\pm$ 0.82 (39.54)	1.03	0.34
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	25.61 $\pm$ 1.2	22.70 $\pm$ 1.0 (88.64)	18.90 $\pm$ 0.92 (73.80)	16.81 $\pm$ 0.92 (65.64)	1.01	0.34
Total soluble starch <i>Amidon soluble total</i>	3.41 $\pm$ 0.24	2.81 $\pm$ 0.20 (82.40)	2.42 $\pm$ 0.12 (70.97)	1.72 $\pm$ 0.10 (50.44)	0.16	0.03
Sucrose <i>Saccharose</i>	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01 (75.00)	0.02 $\pm$ 0.01 (50.00)	0.01 $\pm$ 0.01 (25.00)	0.01	0.002
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	4.00 $\pm$ 0.27	3.61 $\pm$ 0.21 (90.25)	2.73 $\pm$ 0.12 (68.25)	2.00 $\pm$ 0.12 (50.00)	0.18	0.04
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	41.32 $\pm$ 2.2	39.21 $\pm$ 1.9 (94.89)	35.00 $\pm$ 2.0 (84.70)	30.12 $\pm$ 2.0 (72.89)	2.02	0.57
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	0.70 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.02 (88.57)	0.58 $\pm$ 0.02 (82.86)	0.41 $\pm$ 0.01 (58.57)	0.02	0.003

Table XI. The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on biomolecules of roots of MR2 mulberry genotype. The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. 60-day old saplings were used for analysis. Data in parenthesis indicate % over control values. The values are expressed in mg g^{-1} dw (Dry weight).

Tableau XI. Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les biomolécules des racines du génotype de mûrier MR2. Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. On utilise des plantons de 60 jours pour l'analyse. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs sont exprimées en mg g^{-1} ps (poids sec).

Biomolécules (mg g^{-1} dw) (mg g^{-1} ps)	NaCl Concentrations (mM) Concentrations en NaCl (mM)				SDm	SEm
	0	10	20	30		
Total soluble proteins <i>Protéines solubles totales</i>	13.71 ± 0.73	12.50 ± 0.61 (91.17)	11.90 ± 0.54 (86.80)	10.41 ± 0.49 (75.93)	0.59	0.17
Total free amino acids <i>Acides aminés libres totaux</i>	22.61 ± 1.3	21.60 ± 1.0 (95.33)	20.00 ± 1.1 (88.46)	18.20 ± 0.84 (80.50)	1.06	0.34
Total soluble sugars <i>Sucres solubles totaux</i>	17.90 ± 0.82	16.31 ± 0.91 (91.12)	15.70 ± 0.87 (87.71)	14.60 ± 0.81 (81.56)	0.85	0.26
Total soluble starch <i>Amidon soluble Total</i>	3.90 ± 0.20	2.81 ± 0.15 (72.05)	1.61 ± 0.11 (41.28)	1.00 ± 0.02 (25.64)	0.12	0.03
Sucrose <i>Saccharose</i>	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01 (80.00)	0.04 ± 0.01 (80.00)	0.03 ± 0.01 (60.00)	0.01	0.002
Total phenols <i>Phénols totaux</i>	5.31 ± 0.28	4.20 ± 0.20 (79.09)	3.71 ± 0.12 (69.87)	2.11 ± 0.10 (39.74)	0.17	0.04
Total lipids <i>Lipides totaux</i>	40.00 ± 2.0	37.32 ± 1.8 (93.30)	34.31 ± 2.0 (85.77)	31.00 ± 2.0 (77.50)	1.95	0.62
Ascorbic acid <i>Acide ascorbique</i>	0.72 ± 0.02	0.62 ± 0.02 (86.11)	0.55 ± 0.02 (76.39)	0.42 ± 0.01 (58.33)	0.15	0.002

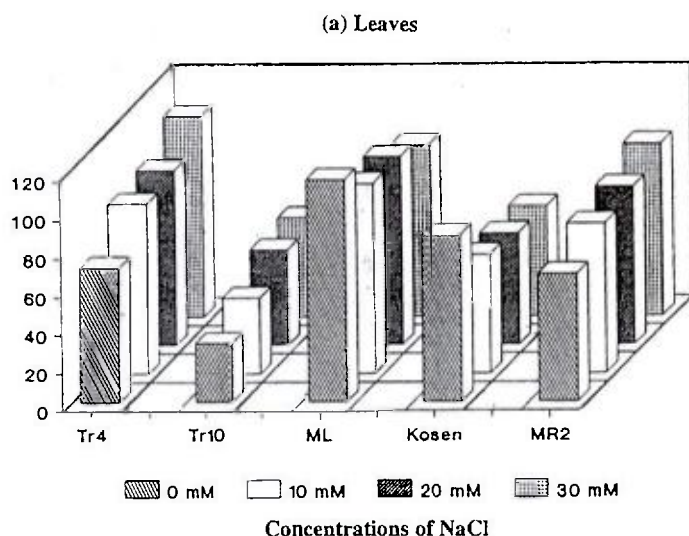


Figure 2 (a & b). The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on the levels of total nitrogen in leaves and roots ($\text{mg g}^{-1} \text{ dw}$) of five different mulberry genotypes grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ \text{C}$). 60-day old saplings were used for analysis. The data are the mean of three different experiments with SEM of ± 0.67 .

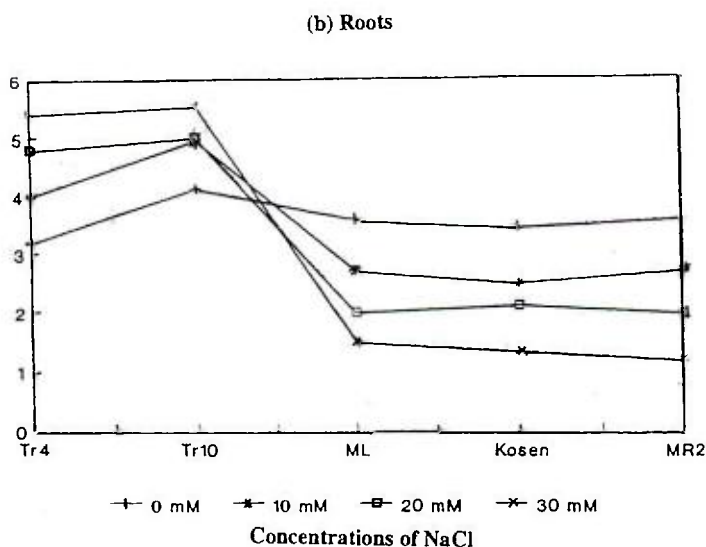


Figure 2. (a: feuilles & b : racines). Effet de la salinité NaCl (0 à 30mM) sur les niveaux d'azote total dans les feuilles et les racines ($\text{mg g}^{-1} \text{ ps}$) de cinq génotypes de mûrier différents cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ \text{C}$). On utilise des plantons de 60 jours pour l'analyse. Les données sont la moyenne de trois expériences différentes avec un intervalle de confiance de la moyenne de $\pm 0,67$.

(a) Leaves

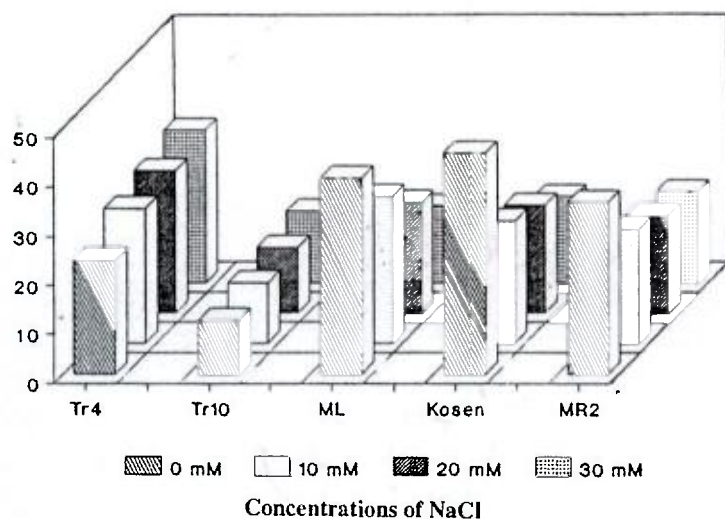


Figure 3. (a & b). The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on the levels of nitrate in leaves and roots (mg g⁻¹ dw) of five different mulberry genotypes grown in hydroponics at room temperature (30 ± 1 °C). 60-day old saplings were used for analysis. The data are the mean of three different experiments with SEM of ± 0.25.

(b) Roots

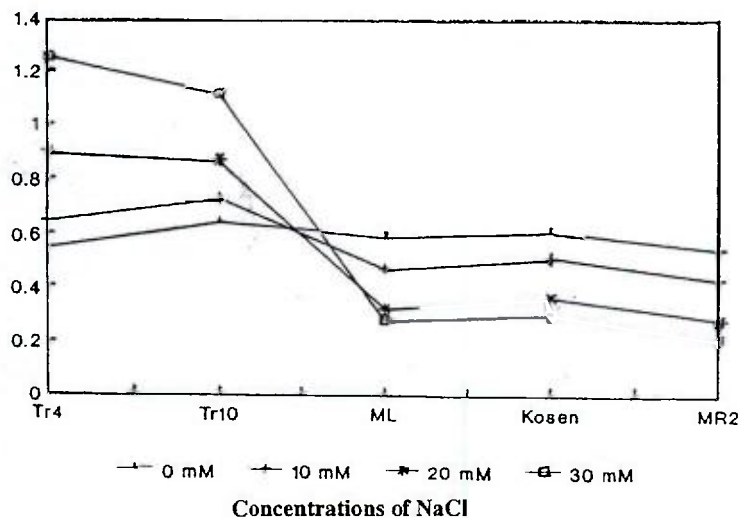


Figure 3. (a. feuilles & b. racines). Effet de la salinité NaCl (0 à 30 mM) sur les niveaux de nitrates dans les feuilles et les racines (mg g⁻¹ ps) de cinq différents génotypes de mûrier cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante (30 ± 1 °C). On utilise des plantons de 60 jours pour l'analyse. Les données sont la moyenne de trois expériences différentes avec un intervalle de confiance de la moyenne de ± 0,25.

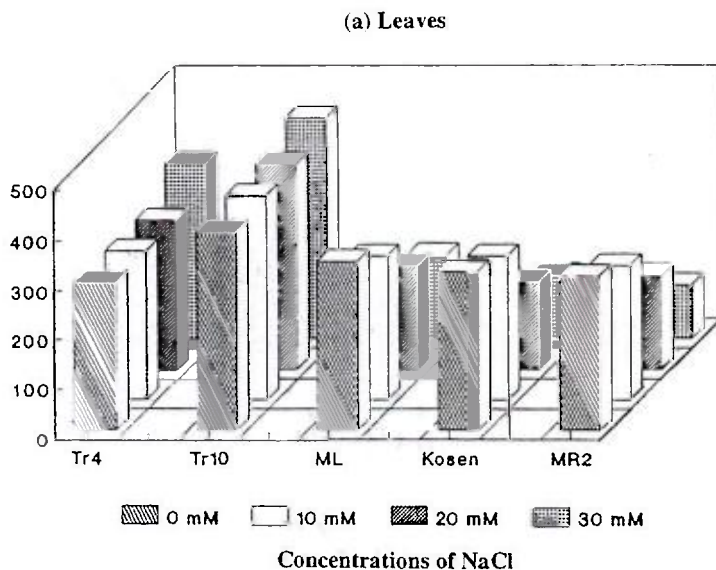


Figure 4 (a & b). The effect of NaCl salinity (0 to 30 mM) on the levels of nitrite in leaves and roots ($\mu\text{g g}^{-1}$ dw) of five different mulberry genotypes grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$). 60-day old saplings were used for analysis. The data are the mean of three different experiments with SEM of ± 1.04 .

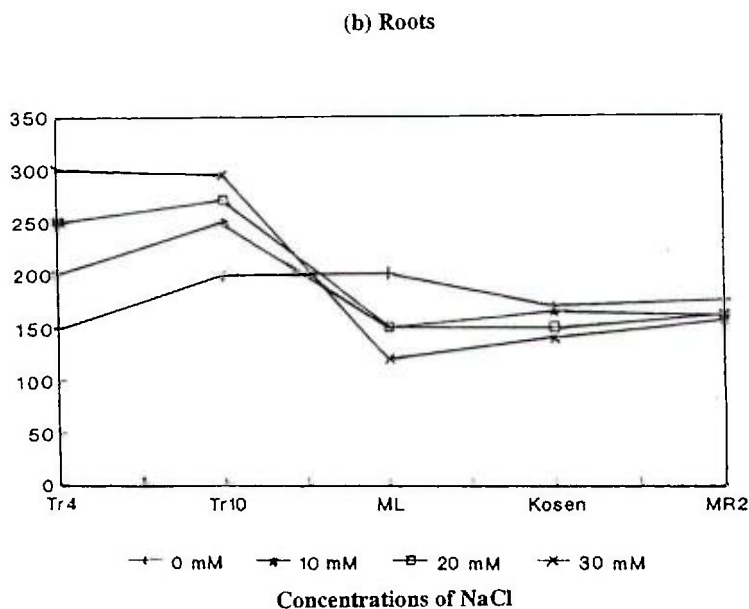


Figure 4. (a & b). Effet de la salinité NaCl (0 to 30 mM) sur les niveaux de nitrites dans les feuilles et les racines ($\mu\text{g g}^{-1}$ ps) de cinq différents génotypes de mûrier cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ\text{C}$). On utilise des plantons de 60 jours pour l'analyse. Les données sont la moyenne de trois expériences différentes avec un intervalle de confiance de la moyenne de $\pm 1,04$.

Table XII. Photosynthetic CO₂ uptake ($\mu\text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) of five mulberry genotypes in response to NaCl treatment (0 to 30 mM). The saplings were grown in hydroponics at room temperature ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) with a relative humidity of $60 \pm 5\%$. When the saplings attained 60 days of growth, photosynthetic CO₂ measurements were made by using portable infrared gas analyser. Data in parenthesis indicate % over control values.

Tableau XII. Absorption photosynthétique de CO₂ ($\mu\text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) chez cinq génotypes de mûrier en réponse au traitement NaCl (0 à 30 mM). Les plantons sont cultivés dans des cultures hydroponiques à température ambiante ($30 \pm 1^\circ \text{C}$) avec une humidité relative de $60 \pm 5\%$. Quand les plantons ont atteint 60 jours de croissance, on fait les mesures photosynthétiques de CO₂ en utilisant un analyseur à gaz infrarouge. Les données entre parenthèses indiquent le % par rapport aux valeurs témoins.

Mulberry genotypes	CO ₂ absorption (μ mol m ⁻² s ⁻¹)						*
Génotypes de mûrier	NaCl concentrations (mM)						
	0	10	20	30	SDm	SEm	
Tr4	17.26 ± 1.2	18.61 ± 1.2 (107.82)	19.14 ± 1.2 (110.89)	19.29 ± 1.3 (111.76)	1.22	0.41	
Tr10	17.00 ± 1.0	17.72 ± 1.1 (104.23)	18.21 ± 1.0 (107.18)	18.72 ± 1.2 (110.12)	1.07	0.35	
Mysore local	18.72 ± 1.3	18.12 ± 1.0 (96.79)	17.62 ± 1.0 (94.12)	17.13 ± 1.0 (91.51)	1.07	0.36	
Kosen	18.60 ± 1.2	17.81 ± 1.2 (95.75)	17.32 ± 1.0 (93.12)	17.00 ± 1.0 (91.40)	1.10	0.37	
MR2	17.93 ± 1.1	17.12 ± 1.1 (95.48)	16.71 ± 1.1 (93.19)	16.13 ± 1.0 (89.96)	1.10	0.37	

The content of ascorbic acid was found to increase steadily at increasing concentrations of salinity in most genotypes. Total soluble starch and sucrose were reduced significantly in most genotypes at increasing concentrations of salinity. As regards to roots total soluble sugars, phenols and ascorbic acid increased in Tr4 and Tr10, whereas in all other genotypes these constituents were reduced. In most of the constituents like proteins, amino acids, soluble starch, sucrose and total lipids, a significant reduction occurred at either 20 or 30 mM NaCl (Tables VII to XI).

As regards leaf total nitrogen, although different genotypes had different levels of nitrogen, it was not affected significantly by NaCl salinity (Fig. 2 (a)). Regarding nitrate, it is interesting that in Tr4 and Tr10 the effect of salinity on nitrate absorption is hardly observed, whereas in other three genotypes Mysore Local, Kosen and MR2, nitrate levels were reduced gradually as the NaCl concentration increased (Fig. 3(a)). As regards nitrite content, hardly any effect could be observed in

Mysore Local, Kosen and MR2. On the other hand, in Tr4 and Tr10, the levels of nitrite increased by about two-fold over the control (Fig. 4(a)). The root total nitrogen content of Tr4 and Tr10 increased with salinity treatments (Fig. 2 (b)) and in all other genotypes total nitrogen decreased compared to the control. Both nitrate and nitrite contents were not affected by salt treatment in Tr4 and Tr10 (Figs. 3(b) and 4(b)), whereas in other genotypes a decreasing trend was observed, compared to the control. The photosynthetic capacity as measured by CO_2 absorption ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) using Infra Red Gas Analyser (IRGA) was not affected in Tr4 and Tr10 when compared to other genotypes (Table XII).

DISCUSSION

In Tr4 and Tr10 NaCl-induction of chlorophyll accumulation was observed whereas in other genotypes this pigment was decreased with increasing concentrations of NaCl. A similar observation was also made in total carotenoids. Ramanjulu *et al.* (1993) reported that carotenoids increased under NaCl salinity in mulberry var. Mysore Local. An increase in total chlorophyll content was reported at low salt concentrations in grape (Pandey and Divatc, 1976) and rice (Baset and Jahanara Arju, 1989). Varshney and Bajjal (1977) also observed increases in total chlorophyll, chlorophyll 'a' and chlorophyll 'b' in grasses under salinity, but the decrease in the ratio of chlorophyll a:b was ascribed to a greater increase in chlorophyll 'b' than in chlorophyll 'a'. Parasher and Varma (1985) noted an increase in chlorophyll content of salt-stressed wheat leaves, which was due to an increase in chlorophyll 'b'; actually there was decrease in chlorophyll 'a'. Stroganov *et al.* (1973) and Peiris and Ranasinghe (1993) observed that salt sensitive species lost chlorophylls, but salt tolerant species accumulated chlorophylls is very much attributed to the present study. Regarding chlorophyll stability index (CSI), except in Tr4 and Tr10, in all other genotypes the CSI was significantly reduced indicating saline tolerance nature of both Tr4 and Tr10 against NaCl.

In both Tr4 and Tr10, free amino acids and soluble sugars increased, whereas total soluble proteins, total soluble starch and sucrose showed a decreasing trend. A common feature of salinity is the occurrence of derangements in protein metabolism. This decrease in proteins can be attributed to enhanced proteolytic activity or reduced rates of synthesis (Gururaja Rao, 1980), both processes resulting in the accumulation of amino acids (Gururaja Rao and Rajeswara Rao, 1979; Gururaja Rao *et al.*, 1980). It has been shown that salt stress induces accumulation of free amino acids, quarternary ammonium and other osmoregulatory compounds in salt tolerant plants (Stewart *et al.*, 1979; Popp *et al.*, 1984). Shaik Mohamed Anas and Vivekanandan (1999) observed an increasing level of glycine betaine, proline and polyols with increasing salinity in Tr4 and Tr10 when compared to other salt sensitive mulberry genotypes. Salinity is known to depress many metabolic pathways and energy-generation processes. Soluble sugars have been reported to increase with increasing salinity. Such an increase of metabolites under saline conditions may possibly be attributed to decreased incorporation of monomers into macromolecules (Dhingra and Varghese, 1986; Dhingra and Sharma, 1993). In fact, the content of starch is significantly reduced in both Tr4 and Tr10. Decreased starch contents in response to NaCl has also been reported in grapes (Downton and Loveys, 1981), *Zea mays* L. (Dhingra and Varghese, 1985) and chick pea (Dhingra *et al.*, 1994). As a matter of fact, net assimilation rate (Shaik Mohamed Anas, 1996) is drastically reduced in both the mulberry genotypes even at 10 and 20 mM NaCl treatment. This is reflected in the reduced content of sucrose in both genotypes. Hydrolysis of starch by amylases contributing to the pool of sugars is not ruled out. The increase in free amino acids observed in both genotypes is in agreement with marginally reduced protein levels. The decrease in protein level has been reported by various workers (Rouxel *et al.*, 1989; Perez-Alfocea *et al.*, 1993; Potluri Sasikala and Devi Prasad, 1994). The increase in free amino acids might reflect a retardation of protein synthesis or inhibition of amino acid incorporation into proteins (Poljakoff-Mayber, 1982). Total lipids and sterols were reduced with increasing salinity. Both lipids and sterols have slow turnover rates, which depend on the age of the plant, and therefore

it is not clear whether they could be taken as an indicator of salt tolerance. The content of β -carotene and ascorbic acid increased with salinity. Higher levels of β -carotene in response to stress have been indicated by several authors (Lers *et al.*, 1990; Cowan and Rose, 1991). The increment in ascorbic acid is considered to be a stress tolerance marker (Mukherjee *et al.*, 1991) and in fact, as pointed out earlier, its content specifically increases in Tr4 and Tr10.

Since nitrogen metabolism plays a vital role in the physiology and growth of the plant, total nitrogen, nitrate and nitrite contents were determined in both the roots and leaves. It is evident that both Tr4 and Tr10 mulberry genotypes have the potential to carry on nitrogen metabolism comparatively in a better way than the rest of the genotypes as evidenced by increased levels of total nitrogen, nitrate and nitrite in leaves as well as in roots. The above contention that Tr4 and Tr10 are saline tolerant is supported by several observations made by different workers on different plants. Nitrogen an important element required for growth of the plant is reported to be affected under salt stress (Frota and Tucker, 1978; Luque and Bingham, 1981). Wallace and Berry (1981) suggested that salinity may not be entirely due to Cl^- toxicity but partly to induced deficiency of nitrate. Most sensitive tomato is reported to exhibit greatest reductions in stem and leaf nitrate concentration with salinity (Perez-Alfocea *et al.*, 1993). Salinity at the whole-plant level affects photosynthesis, carbon, energy and nitrogen metabolism, and further leads to both increases and decreases in various enzymatic activities (Levitt, 1980). Measurement of photosynthetic capacity as measured by CO_2 absorption using Infra Red Gas Analyser (IRGA), - generally salinity affects photosynthesis in two major ways by limitation due to the reduced stomatal conductance and inhibition rates of biological processes, - did not reveal any serious difference among the genotypes, particularly in Tr4 and Tr10. In summary, it may be concluded that Tr4 and Tr10 have the potency to grow in saline soil when compared to other genotypes as is evident by the unaffected levels of chloroplast pigments, free amino acids, ascorbic acid, β -carotene and CO_2 uptake and also to perform nitrogen metabolism comparatively in a better way than the rest of the genotypes as is evident by the marginal increase in total nitrogen, nitrate and nitrite contents in both leaves and roots in addition to that the significant rooting ability up to 30 mM NaCl as observed in the earlier studies. The contents of soluble sugars coupled with β -carotene and ascorbic acid and total phenols were higher than any other genotype possibly indicating the inherent potential for saline tolerance nature of Tr4 and Tr10. Thus it becomes evident that in the leaves certain genes up-regulated in response to NaCl stress. It is also evident that shoot and root respond differently to salinity. At this juncture, it may be worthwhile to point out that the roots accumulate more phenols than the leaves under saline condition.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial assistance provided by the Central Silk Board, Government of India, Bangalore in carrying out the work is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- ARNON D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 1-15.
- BARAKAT M.Z., SHENAB S.K., AND EL-ZOHARY D. N. (1973) A new titrimetric method for the determination of vitamin C. Analytical Biochem., 53, 245.
- BASET Q.A., AND ARJU J. (1989) Variations in concentrations of potassium, sodium and chlorophyll pigments in leaf segments of two rice varieties differing in sensitivity to salinity. Indian J. Plant Physiol., 32(2), 99-104.
- BRAGDON J.H. (1951) Estimation of total fat. J. Biol. Chem., 190, 513-514.
- CHOWDHURY J.W., JAIN S., AND JAIN P.K. (1993) Biotechnological approaches for developing salt tolerant field crops. J. Plant Biochem and Biotech., 2, 1-7.

- COWAN A.K., AND ROSE P. D. (1991) Abscissic acid metabolism in salt-stressed cells of *Dunaliella salina*. Possible interrelationship with β -carotene accumulation. *Plant Physiol.*, 97, 798-803.
- DHINGRA H.R., AND SHARMA P.K. (1993) Biochemical and mineral composition of young healthy and thrivelled mungbean (*Vigna radiata* L. Wilkzek) seeds in response to salinity. *Indian J. Plant Physiol.*, 36(2), 115-117.
- DHINGRA H.R., AND VARGHESE T.M. (1985) Effect of salt stress on viability, germination and endogenous levels of some metabolites and ions in maize (*Zea mays* L.) pollen. *Ann. Bot.*, 55, 415-420.
- DHINGRA H.R., AND VARGHESE, T.M. (1986) Effect of NaCl salinity on the activities of amylase and invertase in *Zea mays* L. pollen. *Ann. Bot.*, 57, 101-104.
- DHINGRA H.R., VARGHESE T.M., AND KAJAL N. (1994) Salinity induced changes in carbohydrate metabolism and inorganic constituents in the developing chickpea seeds. *Indian J. Plant Physiol.*, 36(1), 21-24.
- DORCUS D. (1995) Evaluation of mulberry genotypes for drought resistance in alkaline soil. Ph.D thesis, Bharathidasan University, Tiruchirapalli, India.
- DOWNTON W.J.S., AND LOVEYS B.R. (1981) Abscissic acid content and osmotic relations of salt-stressed grapevine leaves. *Aust J. Plant Physiol.*, 8, 443-452.
- DUBOIS M., GILLIES K.N., HAMILTON J.K., REBERS P.A., AND SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 300-356.
- FROTA J.N.E., AND TUCKER T.C. (1978) Absorption rates of ammonium and nitrate by red kidney beans under salt and water stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42, 753-756.
- GOODWIN T.W. (1954) Carotenoids. *In: Handbook of plant analysis*. K. Peach and M. V. Tracey, eds. Springer, Berlin, pp. 272-311.
- GURURAJA RAO G. (1980) Physiological studies on the influence of sodium chloride salinity on leaf metabolism in pigeon pea (*Cajanus indicus* Spreng) and gingelley (*Sesamum indicum* L.). Ph.D Thesis, S. V. University, Tirupati, India.
- GURURAJA RAO G., AND RAJESWARA RAO G. (1979) Sodium chloride salinity induced keto acids and amino acid changes in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. *Indian J. Plant Physiol.*, 22(1), 121-126.
- GURURAJA RAO G. MALLIKARJUNA K. GOPALA RAO P., & RAJESWARA RAO G. (1980) Physiological studies in early seedling growth in green gram (*Phaseolus radiatus* L.) under NaCl salinity. *Indian J. Exp. Biol.*, 18, 320-322.
- HEWITT E.J. (1966) The composition of the nutrient solution. *In: Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. pp. 199. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal Bucks, England.
- JOHNSON D.W., SMITH S.E., AND DOBRENZ A.K. (1992) Selection for increased forage yield in alfalfa at different NaCl levels. *Euphytica*, 60, 27-35.
- KING E.J., AND WOOTEN I.D.P. (1959) Micro-analysis in medical biochemistry. pp. 42. Churchill, London.
- KRISHNASWAMY S. (1978) Mulberry cultivation in South India. CSR&TI Bulletin No. 1, Mysore, India.
- LEERS A., BIENER Y., AND ZAMIR A. (1990) Photo induction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. Kinetics and dependence on gene activation. *Plant Physiol.*, 93, 389-395.
- LEVITT J. (1980) Responses of plant to environmental stress chilling, freezing and high temperature stresses. Academic Press, New York.
- LOWRY P.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., AND RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUQUE A.A., AND BINGHAM F.T. (1981) The effect of the osmotic potential and specific ion concentration of the nutrient solution on the uptake and reduction of nitrate by barley seedlings. *Plant and Soil*, 63, 227-37.

- MCCREADY R.M., GUGGOLZ J., SILVIERA V., AND OWENS H.S. (1950) Determination of starch and amylase in vegetables. *Anal. Chem.*, 22, 1156.
- MUKHERJEE S.P., BANERJEE S.N., GUPTA S., AND MUKHERJEE B.B. (1991) Effect of water, salt and freezing stress on *Brassica juncea* (L.) Czern (var. 85-59) callus. *Indian J. Exp. Biol.*, 29, 182-183.
- MURTY K.S., AND MAJUMDAR S.K. (1962) Modification of the technique for determination of chlorophyll stability index in relation to studies of drought resistance in rice. *Current Science*, 11, 470-471.
- PANDEY R.M., AND DIVATE M.R. (1976) Salt tolerance in grapes. I. Effects of sodium salts singly and combination on some of the morphological characters of grape plants. *Indian J. Plant Physiol.*, 19(2), 230-239.
- PARASHER A., AND VARMA S.K. (1985) Effect of pre-sowing seed soaking treatment of gibberellic acid on germination and early seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under saline conditions. *Proceedings of the National Seminar on Plant Physiology*, Varanasi, India.
- PEIRIS B.D., AND RANASINGHE A. (1993) Effect of sodium chloride salinity on chlorophyll content in rice (*Oryza sativa*) leaves. *Indian J. Plant Physiol.*, 36(4), 257-258.
- PEREZ-ALFOCEA F., ESTON M.T., SANTACRUZ A., AND BOLARIN M.C. (1993) Effect of salinity on nitrate, total nitrogen, soluble protein and free amino acid levels in tomato plants. *J. Horti. Sci.*, 68 (6), 1021-1027.
- POLJAKOFF-MAYBER A. (1982) Biochemical and physiological responses of higher plants to salinity stress. *In: Biosaline Research*. A. San Pietra ed. Plenum Press, New York, pp. 245-70.
- POPP M., LARHER F., AND WEIGEL P. (1984) Chemical composition of Australian mangroves III: Free amino acids, total methylated ammonium compounds and total nitrogen. *Z. pflanzenphysiol.*, 114, 15-25.
- POTLURI SAsIKALA D.P., AND DEVI PRASAD P.V. (1994) Salinity effects on in vitro performance of some cultivars of potato. *R. Brsa. Fisiol. Veg.*, 1(1), 1-6.
- RAMANJULU S., VEERANJANEYALU K., AND SUDHAKAR C. (1993) Physiological changes induced by NaCl in mulberry var. Mysore Local. *Indian J. Plant Physiol.*, 36(4), 273-275.
- RAMANJULU S., VEERANJANEYALU K., AND SUDHAKAR C. (1994) Short-term shifts in nitrogen metabolism in mulberry *Morus alba* under salt shock. *Phytochemistry*, 37, 991-995.
- ROUXEL M.F., SINGH J.P., BEOPOULOS N., BILLARD J.P., AND ESNAULT R. (1989) Effect of salinity stress on ribonucleolytic activities in glycophytic and halophytic plant species. *J. Plant Physiol.*, 133, 738-742.
- SHAIK MOHAMED ANAS S. (1996) Effects of sodium chloride salinity on mulberry. Ph.D thesis, Bharathidasan University, Tiruchirapalli, India.
- SHAIK MOHAMED ANAS S., AND VIVEKANANDAN M. (1994) Evaluation of salinity tolerance in mulberry varieties by exploiting rooting potential. *Sericologia* 34(2), 311-321.
- SHAIK MOHAMED ANAS S., AND VIVEKANANDAN M. (1999) Accumulation of certain organic metabolites in different mulberry genotypes during NaCl salinity. *Sericologia*, 39(3), 441-446.
- SHAIK MOHAMED ANAS S., AND VIVEKANANDAN M. (2000a) Effect of NaCl salinity on internal distribution of Na^+ , K^+ , Cl^- and Ca^{2+} in mulberry genotypes. *Sericologia*, 40(4), 611-618.
- SHAIK MOHAMED ANAS S., AND VIVEKANANDAN M. (2000b) Influence of NaCl salinity on the behavior of hydrolases and phosphatases in mulberry genotypes: Relationship to salt tolerance. *J. Plant Biol.*, 43(4), 217-225.
- STEWART G.R., LARHER F., AHMAD I., AND LEE J.A. (1979) Nitrogen metabolism and salt tolerance in higher plant halophytes. *In: Ecological Process in Coastal Environment*. R. L. Jefferies and A. J. Davy, eds. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, pp. 211-228.
- STROGOV B.P., KABANOV V.V., SHERJAKOVA N.I., LAPINA L.P., KOMIZERKO E.I., POPOV B.A., DOSTANOVA R.K.H., AND PRYKHOD K.O.L.S. (1973) A Marcado Trans Stand Function of Plant Cells in Saline Habitats. Halstad Press, Moscow.

- SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S., GIRIDHAR K., AND SENGUPTA K. (1990) Evaluation of germplasm genotypes for drought resistance in mulberry. *Sericologia*, 30(3), 327-341.
- SWAIN T., AND HILLIES W.O. (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative estimation of phenolic constitution. *J. Sci. Food Agric.*, 10, 63-68.
- TROLL W., AND CANON K. (1953) A modified photometric ninhydrin method for analysis of amino-imino acids. *J. Biol. Chem.*, 200, 803-811.
- UMBREIT W.W., BURRIS R.H., AND STAUFFER J.F. (1972) Methods for nitrogen. *In: Manometric and biochemical technique*, Burgers Publishing Co., Minnesota, 5th eds, pp. 259-260.
- VAN HANDEL E. (1968) Dried microdetermination of sucrose. *Analytical Biochem.*, 22, 280-283.
- VARSHNEY K.B., AND BAIJAL B.D. (1977) Effect of salt stress on chlorophyll contents in some grasses. *Indian J. Plant Physiol.*, 20(2), 161-163.
- WALLACE A., AND BERRY. W.L. (1981) Toxicity. The concept and relationship to the dose response curve. *J. Plant Nutri.*, 3, 9-13.
- WOLLEY J.T., HICKS G.P., AND HAGEMAN R.H (1960) Rapid determination of nitrate and nitrite in plant material. *J. Agric Food Chem.*, 8, 481-482.
- YADAV J.S.P., BANDYOPADHYAY A.K., RAO K.V.G.K., SINHA T.S., & BISWAL C.R.L. (1979) Coastal saline soils of India. Bulletin No. 5. Central Soil Salinity Research Institute, Karnal, India.
- ZAR G.A (1974) Biostatistical analysis. Prentice Hall, India.

REPONSES BIOCHIMIQUES DE GENOTYPES DE MURIER A LA SALINITE

S. SHAIK MOHAMED ANAS¹ & M. VIVEKANANDAN²

1. International Centre for Water and Energy Systems, P. O. Box 2623, Abu Dhabi, Emirats Arabes Unis.
2. Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirapalli – 620 024, Tamil Nadu, Inde.

*Nous avons cultivé cinq géotypes différents de mûrier (Tr4, Tr10, Mysore Local, MR2 de **Morus indica** et Kosen de **Morus lafifolia**) dans des solutions contenant différentes concentrations de NaCl (0, 10, 20 et 30 mM) dont les valeurs de CE sont comprises entre 0,52 et 4,60 mS cm⁻¹ avec un pH d'une valeur de 7 pour analyser la composition en pigments, les constituants biochimiques, les composants azotés et l'absorption photosynthétique de CO₂ en réponse à la salinité. Les pigments du chloroplaste, qui sont largement utilisés comme marqueurs de la tolérance au sel, augmentent de manière significative à la fois chez les géotypes Tr4 et Tr10. Pour ce qui est des constituants biochimiques, les sucres solubles totaux associés au β -carotène et à l'acide ascorbique sont relativement plus élevés dans les feuilles de Tr4 et Tr10. En ce qui concerne la racine de Tr4 et de Tr10, les sucres solubles totaux, l'acide ascorbique et les phénols totaux y sont plus élevés que chez n'importe quel autre géotype, ce qui indique probablement une tolérance de Tr4 et de Tr10. Tr4 et Tr10 sont capables de métaboliser l'azote d'une manière comparativement meilleure que les autres géotypes comme le prouvent l'augmentation marginale des teneurs en azote total, en nitrates et en nitrites et l'augmentation des niveaux d'azote total, de nitrates et de nitrites dans les racines. La salinité n'a pas d'effet sur l'absorption photosynthétique du CO₂ chez tous les géotypes particulièrement chez Tr4 et Tr10.*

INTRODUCTION

La salinité est un problème largement répandu dans les régions arides et semi-arides qui entraîne une baisse significative de la productivité agricole. On a rapporté qu'environ 25 % de la terre cultivée dans le monde sont affectés par le sel (Chowdhury et coll., 1993). En Inde la zone affectée par la salinité représente environ 7 millions d'hectares, dont 2,1 millions d'hectares comprennent des sols salins situés dans les zones côtières (Yadav et coll., 1979). La salinité limite les rendements des cultures sur environ un tiers des terres irriguées dans le monde et la salinisation continue à augmenter dans le monde entier (Johnson et coll., 1992). L'amendement, l'assèchement et des pratiques d'irrigation améliorées pourraient réduire la sévérité et l'étendue de la salinisation dans certaines régions mais les coûts de ces pratiques sont en général excessifs particulièrement dans les pays en voie de développement comme l'Inde. Une solution peu coûteuse, à court terme, pourrait être la mise au point de géotypes qui tolèrent des niveaux faibles ou modérés de salinité. Dans les mûraies des régions tropicales et sub-tropicales, les précipitations annuelles sont souvent insuffisantes pour évacuer les sels accumulés dans la zone de la racine.

En Inde, la sériciculture (l'élevage des vers à soie en utilisant des feuilles de mûrier) est devenu le gagne-pain de plus de six millions d'individus dans plus de 52 000 villages. Le mûrier est un arbre d'une grande valeur pour l'industrie séricicole et sa culture extensive est largement recommandée

dans le Tamil Nadu pour augmenter la production de soie. Les feuilles de mûrier sont les seules plantes hôtes du ver à soie monophage (*Bombyx mori* L.). Bien que des essais aient été réalisés pour identifier des génotypes de mûrier adaptés à l'absence d'irrigation (Susheelamma et coll., 1990 ; Dorcus, 1995) il existe relativement peu ou aucune recherche sur la salinité (Ramanjulu et coll., 1994 ; Shaik Mohamed Anas et Vivekanandan, 1994, 1999, 2000a et 2000b). Cette étude a donc été entreprise : cinq génotypes différents de mûrier (Tr4, Tr10, Mysore Local, Kosen et MR2) ont été cultivés de manière hydroponique avec des concentrations variées de NaCl pour comprendre les effets directs de la salinité sur le mûrier. Nous avons évalué la composition en pigments, les constituants biochimiques, les composés azotés et l'absorption photosynthétique de CO₂ pour déterminer leur potentiel inhérent de croissance dans un sol salin. Cette étude traite de la salinité NaCl puisque c'est l'un des sels les plus importants dans les zones salines dans le Tamil Nadu et ses alentours. Le NaCl est utilisé comme agent de sélection (Chowdhury et coll., 1993) dans la plupart des programmes d'évaluation car il pourrait contribuer à l'identification de génotypes résistants au stress salin et ionique.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences sont réalisées de 1996 à 1997 dans le laboratoire de Biotechnologie, de la *School of Life Sciences* (Sericulture), de l'Université de Bharathidasan, dans le Tamil Nadu en Inde. Les boutures de cinq génotypes de mûrier différents (Tr4, Tr10, Mysore Local, Kosen et MR2) recueillies dans la mûraie de l'Université de Bharathidasan, de 15 cm de longueur avec 4 à 5 bourgeons vivants (Krishnaswamy, 1978) sont plantées dans des plateaux de culture (45 × 30 × 9 cm). Vingt-cinq boutures sont insérées par plateau de culture que l'on recouvre avec une feuille de *thermacole* perforé pour chaque concentration en NaCl. L'extrémité de la bouture coupée au ciseau est trempée dans une solution expérimentale. Trois plateaux de culture de 25 boutures chacun sont utilisés pour chaque concentration de NaCl pour les répétitions. On prépare la solution de culture habituelle en suivant la méthode d'Hewitt (1966). On ajoute le NaCl immédiatement pour donner les concentrations finales de 10, 20 et 30 mM et le pH de la solution est ajusté à 7,0 avec NaOH à 0,1N. La conductivité électrique des solutions est respectivement de 2,70 ; 3,90 et 4,60 MS cm⁻¹. La solution nutritive de base sert de témoin (0,52 mS cm⁻¹). La solution de culture est changée tous les 3 jours. Les boutures sont cultivées en laboratoire sous une lumière blanche naturelle avec une intensité de 600 µE m⁻² s⁻¹ à une température de 30 ± 1° C et une humidité relative d'environ 60 ± 5 %. Des plants de soixante jours sont retirés avec soin des plateaux de culture et les feuilles et les racines sont lavées avec de l'eau distillée et utilisées pour l'analyse biochimique. On procède à l'analyse des pigments du chloroplaste et des caroténoïdes en suivant respectivement les méthodes d'Arnon (1949) et de Goodwin (1954). On détermine l'indice de stabilité de la chlorophylle (CSI) d'après la méthode de Murty et Majumdar (1962). On procède au dosage des protéines solubles totales d'après la méthode de Lowry et coll., (1951). On détermine les sucres solubles totaux et les acides aminés libres totaux en suivant respectivement les méthodes de Dubois et coll., (1956) et de Troll et Canon (1953). On estime les phénols totaux, l'amidon soluble total, le saccharose, les stérols, le β-carotène, l'acide ascorbique, les lipides totaux en utilisant respectivement les méthodes de Swain et Hillies (1959), McCready et coll., (1950), Van Handel (1968), King et Wooten (1959), Goodwin (1954), Barakat et coll., (1973) et Bragdon (1951). La teneur en azote total est estimée d'après la méthode microkjeldahl modifiée d'Umbreit et coll., (1972). On estime les teneurs en nitrates et en nitrites d'après les descriptions de Wolley et coll., (1960). Toutes les analyses sont réalisées au moins trois fois à partir de trois lots d'expériences indépendantes. Les données recueillies pendant la durée de cette étude sont soumises à une analyse statistique (Ecart type et Intervalle de Confiance) en adoptant les procédures habituelles décrites par Zar (1974).

RESULTATS

L'analyse des pigments du chloroplaste pour les cinq génotypes est présentée dans le Tableau I. Chez Tr4 et Tr10, la salinité n'a pas d'effet négatif sur les chlorophylles "a" et "b" ainsi que sur les caroténoïdes. En fait, il y a une augmentation très importante de la teneur en chlorophylle "a" (presque multipliée par deux) chez Tr4. Chez Mysore local, les niveaux de chlorophylle "a", "b" et les caroténoïdes sont à peine affectés. Chez Kosen et MR2, il s'avère que la "chlorophylle "a" est affectée d'environ 30 à 35 % avec 20 à 30 mM de NaCl tandis que pour la chlorophylle "b" la diminution est de 35 à 42 % avec 30 mM de NaCl. Chez Kosen, les caroténoïdes sont à peine affectés et chez MR2, on observe une diminution des caroténoïdes d'environ 25 % avec 30 mM de NaCl.

Puisque les niveaux de chlorophylle "a" et "b" ne sont pas affectés du tout à la fois chez Tr4 et Tr10, en fait on constate une augmentation de leurs niveaux, il est logique de calculer l'indice de stabilité de la chlorophylle (CSI) (Murty et Majumdar, 1962). Chez Tr4 et Tr10, le CSI s'avère toujours plus élevé que le CSI obtenu pour 0 mM de NaCl, tandis que dans les autres cas le CSI s'avère avoir beaucoup diminué avec 30 mM de NaCl parfois de plusieurs fois, par comparaison à Tr4 et Tr10 (Fig. 1).

Pour estimer l'effet de la salinité sur des biomolécules variées des feuilles, on détermine leurs niveaux chez différents génotypes de mûrir (voir les Tableaux II à VI). Les sucres solubles totaux augmentent à un niveau considérable (56 à 66 %) chez Tr4 et Tr10 mais chez Mysore Local, il se produit une diminution significative avec l'augmentation de la salinité (~ 66 %). Chez Kosen, on constate une augmentation de la teneur en sucre, qui double presque avec la salinité, tandis que chez MR2, on ne constate pas un tel effet à n'importe quelle concentration de NaCl. Chez certains génotypes de mûrir comme Tr4 et Tr10, on observe une augmentation de la teneur en acides aminés libres, chez d'autres génotypes, on ne trouve pas que le niveau des acides aminés libres varie tandis que chez Mysore Local le niveau diminue d'environ 40 pour cent avec 30 mM de NaCl. On trouve que les phénols totaux augmentent de manière considérable chez Tr4 et Tr10 tandis que chez les autres génotypes, on observe une diminution qui est de marginale à significative. Les stérols totaux diminuent de manière significative chez tous les génotypes.

On constate que la teneur en acide ascorbique augmente régulièrement avec l'augmentation des concentrations de sels. L'amidon soluble total et le saccharose diminuent beaucoup avec l'augmentation des concentrations de la salinité chez la plupart des génotypes. En ce qui concerne les sucres solubles, les phénols totaux et l'acide ascorbique dans les racines, ils augmentent chez Tr4 et Tr10 tandis que ces constituants diminuent chez tous les autres génotypes. Il se produit une diminution importante de la plupart des constituants comme les protéines, les acides aminés, l'amidon total, le saccharose et les lipides totaux avec 20 ou 30 mM de NaCl (Tableaux VII à XI).

En ce qui concerne l'azote total de la feuille, bien que différents génotypes aient différents niveaux d'azote, il n'est pas affecté de manière importante par la salinité NaCl (Fig. 2(a)). En ce qui concerne les nitrates, il est intéressant de constater qu'on n'observe presque aucun effet de la salinité sur l'absorption des nitrates chez Tr4 et Tr10 tandis que chez trois autres génotypes Mysore Local, Kosen et MR2, les niveaux de nitrates baissent progressivement alors que la concentration en NaCl augmente (Fig. 3(a)). En ce qui concerne la teneur en nitrites, on n'observe presque aucun effet chez Mysore Local, Kosen et MR2. D'autre part, chez Tr4 et Tr10, les niveaux de nitrites augmentent d'environ deux fois par rapport au témoin (Fig. 4(a)). Chez Tr4 et Tr10, la teneur totale en azote de la racine augmente avec les traitements de salinité (Fig. 2(b)) et chez tous les autres génotypes l'azote total baisse par comparaison au témoin. Les teneurs en nitrates et en nitrites ne sont pas affectées par le traitement salin chez Tr4 et Tr10 (Figs. 3(b) et 4(b)) tandis que chez d'autres génotypes, on observe une tendance au déclin par comparaison au témoin. La capacité photosynthétique de Tr4 et de Tr10 mesurée d'après l'absorption de CO_2 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en utilisant un Analyseur à Gaz à infra rouge (IRGA) n'est pas affectée à l'inverse des autres génotypes (Tableau XII).

DISCUSSION

Chez Tr4 et Tr10, on observe une accumulation de la chlorophylle induite par le NaCl tandis que chez d'autres génotypes ce pigment baisse avec l'augmentation des concentrations de NaCl. Nous observons la même chose pour les caroténoïdes totaux. Ramanjuilu et coll., (1993) ont rapporté que les caroténoïdes augmentent avec la salinité NaCl chez la var. Mysore Local du murier. On a rapporté une augmentation de la teneur totale en chlorophylle avec de faibles concentrations de sel chez le raisin (Pandey et Divate, 1976) et le riz (Baset et Jahanara Arju, 1989). Varshney et Baijal (1977) ont aussi observé des augmentations de la chlorophylle totale, de la chlorophylle "a" et de la chlorophylle "b" chez des herbes avec la salinité mais la baisse du ratio chlorophylle a : b est attribuée à une plus grande augmentation de la chlorophylle "b" que de la "chlorophylle "a". Parasher et Varma (1985) ont observé une augmentation de la teneur en chlorophylle dans les feuilles de blé ayant subi un stress salin, qui est due à une augmentation de la chlorophylle "b" car en fait, il y a une baisse de la chlorophylle "a". Stroganov et coll., (1973) et Peiris et Ranasinghe (1993) ont observé que les espèces sensibles au sel perdent de la chlorophylle mais dans notre étude nous avons observé que les espèces tolérantes le sel accumulent de la chlorophylle. En ce qui concerne l'indice de stabilité de la chlorophylle (CSI), le CSI diminue beaucoup chez tous les génotypes à l'exception de Tr4 et Tr10, ce qui indique la nature de tolérance de Tr4 et de Tr10 à l'épreuve du NaCl.

Chez Tr4 et Tr10, les acides aminés libres et les sucres solubles augmentent tandis que les protéines solubles totales, l'amidon soluble et le saccharose présentent une tendance à la baisse. Une caractéristique courante de la salinité est la perturbation du métabolisme des protéines. Cette baisse des protéines pourrait être attribuée à l'augmentation de l'activité protéolytique ou à la réduction des taux de synthèse (Gururaja Rao, 1980), deux processus qui entraînent l'accumulation d'acides aminés (Gururaja Rao et Rajeswara Rao, 1979 ; Gururaja Rao et coll., 1980). On a montré que le stress salin induit une accumulation des acides aminés libres, de l'ammonium quaternaire et d'autres composants osmorégulateurs chez les plantes tolérantes le sel (Stewart et coll., 1979 ; Popp et coll., 1984). Shaik Mohamed Anas et Vivekanandan (1999) ont observé une augmentation du niveau de glycine bêtaïne, de proline et de polyols avec l'augmentation de la salinité chez Tr4 et Tr10 quand on les compare à d'autres génotypes de murier sensibles. On sait que la salinité réduit de nombreuses voies métaboliques et les processus de génération de l'énergie. Il a été rapporté que les sucres solubles augmentent avec l'augmentation de la salinité. Une telle augmentation des métabolites dans des conditions salines pourrait être attribuée à la baisse de l'incorporation des monomères dans les macromolécules (Dhingra et Varghese, 1986 ; Dhingra et Sharma, 1993). En fait, la teneur en amidon diminue de manière significative chez Tr4 et Tr10. On a aussi rapporté la baisse des teneurs en amidon en réponse au NaCl chez le raisin (Downton et Loveys, 1981), *Zea mays* L. (Dhingra et Varghese, 1985) et le pois cassé (Dhingra et coll., 1994). En fait, le taux d'assimilation net (Shaik Mohamed Anas, 1996) baisse radicalement chez les deux génotypes de murier même avec le traitement de 10 et 20 mM de NaCl. Cela se reflète par la baisse de la teneur en saccharose chez les deux génotypes.

On n'exclut pas une hydrolyse de l'amidon par les amylases qui contribuent à la constitution de la réserve de sucres. L'augmentation des acides aminés libres que l'on observe chez les deux génotypes concorde avec la baisse marginale des niveaux de protéines. Plusieurs chercheurs ont rapporté une baisse des niveaux de protéines (Rouxel et coll., 1989 ; Perez-Alfocea et coll., 1993 ; Potluri Sasikala et Devi Prasad, 1994). L'augmentation des acides aminés libres pourrait refléter un retard de la synthèse de protéines ou une inhibition de l'incorporation des acides aminés dans les protéines (Poljakoff-Mayber, 1982). Les lipides et les stérols totaux diminuent avec l'augmentation de la salinité. Les lipides et les stérols ont de faibles taux de rotation, qui dépendent de l'âge de la plante et il n'est donc pas clair s'ils peuvent être pris comme indicateurs de tolérance au sel. La teneur en β -carotène et en acide ascorbique augmente avec la salinité. Plusieurs auteurs ont indiqué des niveaux plus élevés de β -carotène en réponse au stress (Lers et coll., 1990 ; Cowan et Rose, 1991). On considère que l'augmentation de l'acide ascorbique est un marqueur de tolérance au sel

(Mukherjee et coll., 1991) et en fait, comme on l'a fait remarquer plus haut, sa teneur augmente particulièrement chez Tr4 et Tr10.

Puisque le métabolisme de l'azote joue un rôle vital dans la physiologie et la croissance de la plante, nous avons évalué les niveaux totaux en azote, nitrate et nitrite à la fois dans les racines et dans les feuilles. Il est évident que les génotypes de mûrier Tr4 et Tr10 sont tous les deux capables de maintenir le métabolisme de l'azote comparativement mieux que le reste des génotypes comme le montre l'augmentation des niveaux d'azote, de nitrates et de nitrites totaux dans les feuilles ainsi que dans les racines. Nous en avons déduit que Tr4 et de Tr10 tolèrent la salinité en nous appuyant aussi sur plusieurs observations faites par des chercheurs différents sur différentes plantes. On rapporte que l'azote, un élément important nécessaire à la croissance de la plante est affecté par le stress salin (Frota et Tucker, 1978 ; Luque et Bingham, 1981). Wallace et Berry (1981) ont suggéré que la salinité n'est peut-être pas entièrement due à la toxicité de Cl^- mais partiellement à la carence en nitrates induite. On a rapporté que la tomate la plus sensible présente de plus grandes réductions de la concentration en nitrates dans la tige et dans la feuille avec la salinité (Perez-Alfocea et coll., 1993). Au niveau global de la plante, la salinité affecte la photosynthèse, le métabolisme du carbone, l'énergie et le métabolisme de l'azote et de plus entraîne à la fois des augmentations et des baisses d'activités enzymatiques variées (Levitt, 1980). La mesure de la capacité photosynthétique d'après la mesure de l'absorption de CO_2 en utilisant un Analyseur à Gaz Infra Rouge (IRGA) – en général, la salinité affecte la photosynthèse de deux façons principales par la limitation due à la réduction de la conductance stomatale et par l'inhibition des processus biologiques – ne révèle pas de différence majeure entre les génotypes particulièrement chez Tr4 et Tr10.

En résumé, il est possible de conclure que Tr4 et Tr10 sont capables de pousser dans un sol salin quand on les compare à d'autres génotypes comme le prouve les niveaux non affectés des pigments du chloroplaste, des acides aminés libres, de l'acide ascorbique, du β -carotène et de l'absorption de CO_2 et du métabolisme de l'azote, l'augmentation marginale des teneurs totales en azote, en nitrates et en nitrites dans les feuilles et les racines et la capacité de racinement importante jusqu'à 30 mM de NaCl que l'on a observé dans des études antérieures. Les teneurs en sucres solubles, en β -carotène, en acide ascorbique et en phénols totaux sont plus élevées que celles de n'importe quel autre génotype ce qui indique probablement un potentiel naturel inhérent de tolérance au sel de Tr4 et Tr10. Certains gènes dans les feuilles réalisent une régulation vers le haut en réponse au stress NaCl. Il est aussi certain que la pousse et la racine répondent de manière différente à la salinité. De ce point de vue, il est pertinent de souligner que les racines accumulent plus de phénols que les feuilles dans des conditions de salinité.

SULPHUR UPTAKE IN THREE VARIETIES OF MULBERRY (*MORUS INDICA* L.) UNDER IRRIGATED CONDITION

R. M. SHIVAPRAKASH & U. D. BONGALE*

Karnataka State Sericulture Research & Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore -62,
Karnataka, India.

Sulphur as secondary plant nutrient is required by crops in amounts comparable to phosphorus. Crops with a high production of organic material accordingly have a high demand for sulphur. A field study was conducted with six treatment combinations of three varieties (M5, S36 and Vishwa (DD), and two plant densities (60 × 60 cm and 90 × 90 cm). Recommended doses of NPK@ 300: 120 : 120 kg / ha / yr was applied in five equal split doses to all the treatments. Observations recorded on five harvests of mulberry over one year are presented as pooled data. The leaf and stem sulphur content varied from 0.14 to 0.16% and 0.06 to 0.07% respectively. Sulphur removal through mulberry leaf ranged from 14.20 to 19.77 kg / ha / yr and through stem ranged from 3.29 to 6.43 kg / ha / yr. Total sulphur removal through mulberry shoot (leaf + stem) thus ranged from 17.76 to 27.35 kg / ha / yr. Observations are suggestive of the need for sulphur supplementation to an extent of about 20-25 kg sulphur / ha / yr based on nutrient budgeting in mulberry cultivation.

Keywords: Mulberry, nutrient uptake, spacing, sulphur, variety.

INTRODUCTION

Sulphur as secondary essential plant nutrient is usually required by crops in amounts comparable to phosphorus. Sulphur being a part of amino acids, cystein and methionine, it is essential for protein synthesis and is involved in the formation of chlorophyll (Tandon, 1991). Deficiency of sulphur results in the inhibition of protein synthesis. The total sulphur requirement of different crops depends on the plant biomass production and varies among the crop species as the crops with a high production of organic material have a high demand for sulphur (Mengel and Kirkby, 1978). Mulberry is a high biomass producing foliage crop with special emphasis for production of good quality leaf biomass to meet the qualitative requirements for silkworm rearing. Systematic studies on the amount of sulphur removal and actual requirements of sulphur for the mulberry cultivation are hence needed.

MATERIALS AND METHODS

A field study was conducted with three improved varieties of mulberry namely M5, S36 and Vishwa (DD) in an established mulberry garden at Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore during 1996-97. Soil samples were collected from the experimental garden prior to the commencement of the study following composite sampling method (Black, 1965) to analyse soil fertility status. The soil was of sandy loam type with pH 7.8, organic carbon 0.56%, available phosphorus 22.75 kg / ha and available potassium 340 kg /ha. Cultural practices were

* Author for correspondence

attended as per the package of practices recommended for mulberry under irrigated condition with the supplementation of NPK@ 300: 120: 120 kg / ha / yr (Jolly, 1987) with modification in respect of the phosphorus and potassium which were applied in five equal split doses. The NPK was applied in the form of complex fertilizer (15 : 15 : 15) and differential amounts of nitrogen were applied in the form of urea. In addition, first dose of farmyard manure (FYM) @ 10 ton / ha was applied in first crop and second dose of 10 ton / ha was applied in third crop soon after the second crop harvest. The FYM was applied in between the mulberry rows after making small trenches in each plot and was covered with the soil. The mulberry garden was irrigated once in a week during non-rainy periods. The experiment was laid out in a randomised complete block design (RCBD) with six treatments and three replications each. The experimental plot size was 7.2 × 7.2 m with a plant population of 144 plants in 60 × 60 cm plant spacing and 64 plants in 90 × 90 cm plant spacing. The treatments were as follows:

T1 : M5 with 60 × 60 cm plant spacing

T2: M5 with 90 × 90 cm plant spacing

T3: S36 with 60 × 60 cm plant spacing

T4 : S36 with 90 × 90 cm plant spacing

T5 : DD with 60 × 60 cm plant spacing

T6: DD with 90 × 90 cm plant spacing

Observations on leaf moisture content, stem moisture content, leaf yield, stem yield and shoot yield were recorded at 70 to 75 days of growth. Shoot harvest method was followed for all the five harvests covering one annual crop cycle. Leaf and stem samples were collected from each microplot and fresh weight recorded. The same samples were initially air dried, then oven dried at 70° C and the dry weight recorded. Both leaf and stem samples were powdered and used for the estimation of sulphur in leaf and stem (Black, 1965). Leaf yield, stem yield and shoot yield assessment was done by harvesting all the plants of each microplot (with 100 plants and 36 plants in 60 × 60 and 90 × 90 cm plant spacing respectively) excluding border plants and computed into yield as kg/ha. Based on the leaf and stem sulphur content, the amount of sulphur removed/ha under different treatments was calculated on dry matter basis.

RESULTS

Mulberry leaf yield differed significantly in all the five harvests (Table I). Marked differences in the yield were recorded between closer spacing (60 × 60 cm) and wider spacing (90 × 90 cm). Among the varieties, higher leaf yield was recorded in T3 followed by T5 (54,596 and 51,129 kg /ha/yr), while the lowest leaf yield was recorded in case of M5 variety compared to the DD and S36 varieties which were on par with each other. Similar trend was observed in stem yield and shoot yield also since highest values were recorded in T3 and T5 (Table II and III). Average leaf yield / ha ranged from 9043 kg /ha in T1 to 10,919 kg/ha/harvest in T3 in closer spacing and from 5,648 kg/ha in T2 to 8,602 kg/ha in T6 in wider spacing.

Sulphur content in mulberry leaf did not differ significantly in all the harvests except in fourth harvest. The mean values varied from 0.14% in T3 and T4 to 0.16% in T5 (Table IV). Sulphur content in mulberry stem differed significantly in fourth and fifth harvest and were non significant in first, second and third harvests. Mean values showed that sulphur content in mulberry stems varied from 0.05 in T6 to 0.07% in T1 (Table V).

Table I. Mulberry leaf yield (kg / ha).**Tableau I. Rendement en feuilles de mûrier (kg / ha).**

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Average	Total
<i>Traitements</i>	<i>Récolte I</i>	<i>Récolte II</i>	<i>Récolte III</i>	<i>Récolte IV</i>	<i>Récolte V</i>	<i>Moyenne</i>	
T1	9500	6257	7410	12850	9201	9043	45218
T2	6785	4426	6621	10410	6907	5648	28242
T3	11040	7888	9963	15203	10502	10919	54596
T4	7605	4817	7629	11546	8441	8007	40038
T5	10948	7775	9664	13280	9462	10225	51129
T6	8946	6318	6406	12334	9007	8602	43011
Mean	9137	6247	7949	12604	8920	8971	44857
CD 5%	241	384	661	630	626		

Table II. Mulberry stem yield (kg / ha).**Tableau II. Rendement en tiges de mûrier (kg / ha).**

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Average	Total
<i>Traitements</i>	<i>Récolte I</i>	<i>Récolte II</i>	<i>Récolte III</i>	<i>Récolte IV</i>	<i>Récolte V</i>	<i>Moyenne</i>	
T1	5874	5678	6134	8427	5890	6400	32003
T2	4381	4475	4772	7593	4676	5179	25897
T3	7552	8099	6080	9797	6824	7610	38052
T4	5194	4141	4806	6724	5629	5298	26494
T5	7122	7214	7079	10492	5983	7578	37890
T6	5887	4406	4774	10164	5758	6197	30989
Mean / <i>Moyenne</i>	5951	5669	5607	8866	5793	6377	31889
CD 5 %	490	605	766	814	601		

Table III. Total shoot yield (kg / ha).

Tableau III. Rendement total en pousses (kg / ha).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Average	Total
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne	
T1	15374	11935	13544	21277	15091	15444	77221
T2	11166	8901	11393	18003	11583	12209	61046
T3	18292	15987	16043	25000	17326	18529	92648
T4	12799	8958	12435	18270	14070	13306	66532
T5	18070	14989	16743	23772	15445	17803	89019
T6	14833	10724	11180	22498	14765	11847	59235

Table IV. Sulphur content in mulberry leaf (%).

Tableau IV. Teneur en soufre de la feuille de mûrier (%).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Mean
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne
T1	0.247	0.127	0.133	0.137	0.143	0.157
T2	0.217	0.133	0.14	0.15	0.133	0.154
T3	0.227	0.107	0.133	0.117	0.133	0.143
T4	0.197	0.117	0.147	0.117	0.140	0.143
T5	0.273	0.137	0.13	0.127	0.143	0.162
T6	0.244	0.12	0.14	0.127	0.153	0.156
Mean / Moyenne	0.233	0.123	0.137	0.129	0.14	
CD 5%	NS	NS	NS	0.021	NS	

Table V. Sulphur content in mulberry stem (%)*Tableau V. Teneur en soufre de la tige de mûrier (%).*

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Mean
<i>Traitements</i>	<i>Récolte I</i>	<i>Récolte II</i>	<i>Récolte III</i>	<i>Récolte IV</i>	<i>Récolte V</i>	<i>Moyenne</i>
T1	0.110	0.047	0.113	0.05	0.067	0.077
T2	0.093	0.05	0.077	0.077	0.057	0.07
T3	0.100	0.037	0.063	0.067	0.05	0.063
T4	0.087	0.043	0.077	0.087	0.087	0.075
T5	0.087	0.060	0.077	0.093	0.060	0.075
T6	0.060	0.037	0.083	0.053	0.053	0.057
Mean / <i>Moyenne</i>	0.088	0.04	0.081	0.071	0.062	
CD 5%	N. S.	N. S.	N. S.	0.02	0.018	

Table VI. Sulphur uptake through mulberry leaf (kg / ha)*Tableau VI. Absorption de soufre par la feuille de mûrier (Kg / ha).*

Treatments	Crop I	Crop II	Crop III	Crop IV	Crop V	Average	Total
<i>Traitements</i>	<i>Récolte I</i>	<i>Récolte II</i>	<i>Récolte III</i>	<i>Récolte IV</i>	<i>Récolte V</i>	<i>Moyenne</i>	
T1	5.70	2.070	2.63	4.43	3.13	3.59	17.96
T2	3.70	1.570	2.57	4.13	2.23	2.84	14.20
T3	5.56	2.070	3.47	4.67	3.20	3.79	18.97
T4	3.63	1.470	3.03	3.67	2.73	2.9	14.53
T5	6.80	2.570	3.30	4.07	3.03	3.95	19.77
T6	5.03	1.900	2.40	3.87	3.3	3.30	16.5
Mean / <i>Moyenne</i>	5.07	1.940	2.90	4.14	2.93		
CD 5%	1.56	0.460	0.59	NS	0.58		

Table VII. Sulphur uptake through mulberry stem (kg / ha).

Tableau VII. Absorption de soufre par la tige de mûrier (kg /ha).

Treatments	I Crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Average	Total
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne	
T1	1.33	0.60	1.33	1.10	0.90	1.05	5.26
T2	0.87	0.46	0.66	1.70	0.60	0.85	4.26
T3	1.33	0.53	0.66	1.50	0.67	0.93	4.69
T4	0.80	0.33	0.63	1.43	0.10	0.65	3.29
T5	1.20	0.87	1.00	2.56	0.80	1.28	6.43
T6	0.77	0.37	0.76	1.43	0.77	0.82	4.1
Mean / Moyenne	1.05	0.52	0.84	1.62	0.64		
CD 5%	0.342	N. S.	N. S.	0.474	NS		

Table VIII. Total sulphur uptake in mulberry (kg / ha).

Tableau VIII. Absorption totale de soufre chez le mûrier (kg / ha).

Treatments	I crop	II Crop	III Crop	IV Crop	V Crop	Average	Total
Traitements	Récolte I	Récolte II	Récolte III	Récolte IV	Récolte V	Moyenne	Total
T1	7.03	2.67	3.96	5.53	4.03	4.64	23.22
T2	4.57	2.03	3.23	5.83	2.83	3.69	18.49
T3	6.89	2.60	4.13	6.17	3.87	5.47	27.35
T4	4.47	1.8	3.60	5.10	2.83	3.55	17.76
T5	8.00	3.44	4.30	6.63	3.83	5.24	26.20
T6	5.8	2.27	3.16	5.30	4.07	5.16	25.84

Maximum sulphur removal through leaf was recorded in T5 (19.77 kg / ha / yr) and minimum was recorded in T2 (14.20kg / ha / yr) (Table VI). Sulphur removal through the stem varied from 3.29 kg / ha / yr in T4 to 6.43 kg / ha / Yr in T5 (Table VII). Total sulphur removal through mulberry shoot (leaf + stem) ranged from 17.76 kg / ha / yr in T4 to 27.35 kg / ha / yr in T3 and it ranged from 3.55 to 5.47 kg / ha / harvest (Table VIII).

DISCUSSION

Maximum leaf and shoot yield was recorded in T3 and T5 (with the varieties S36 and Vishwa respectively) which performed better comparatively. This is in accordance with similar other reports on the superiority of these varieties (Ghosh *et al*, 1997 ; Ravikumar *et al*, 1991).

In the present study, where whole shoot harvest was followed for every crop as is done in shoot feeding method, total sulphur removal from one hectare of mulberry garden ranged from 14.20 to 19.77 kg through leaf and from 3.29 to 6.43 kg through the stem. The amount of sulphur absorbed by crops and cropping systems can vary from a few kg to 75-80 kg/ha/yr depending upon the crop, the cropping intensity and yield levels (Tandon, 1989). Application of sulphur containing fertilizer has not so far been covered under the package of practices for mulberry cultivation (Jolly, 1987) even though the farm yard manure has been an indirect source of sulphur. But continuous intensive cultivation of mulberry with high yielding varieties may lead to the depletion of sulphur in the soil. Sulphur being a part of amino acids, cysteine and methionine is essential for the production of protein which is very much required for the silkworm to produce good cocoon crops. Good cocoon yield is known to be mainly influenced by the nutrient status of mulberry leaf (Bongale and Chaluvachari, 1993) which in turn depends on the cultivation practices followed in respect of the agronomic inputs.

Mulberry yield and quality especially in intensive sericultural areas are known to suffer mainly owing to the paucity of soil organic matter contents leading to the deficiencies of soil sulphur contents and micro nutrients availability (Bongale *et al*, 1996). Present observations are hence suggestive of the need for systematic budgeting in respect of sulphur removal and supplementation in mulberry cultivation.

It is concluded that in the present study sulphur removal through mulberry leaf and stem ranged from 14.20 to 19.77 kg and 3.29 to 6.43 kg /ha /yr respectively necessitating the supplementation of about 20-25 kg sulphur per hectare per year based on nutrient budgeting in mulberry cultivation.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank their colleagues for their help and the Institute for providing the facilities.

REFERENCES

- BLACK C. A. (1965) Method of soil analysis. Agronomy monograph No. 9 Amer. Soc. Agron., Medison, Wisconsin, p 770.
- BONGALE U. D., CHALUVACHARI (1993) Evaluation of four mulberry varieties by leaf biochemical analysis and bioassay with *Bombyx mori* L. Indian Bot. Soc., 72, 59-62.
- BONGALE U. D., KRISHNA M., CHALUVACHARI (1996) Effect of multinutrient foliar spray on chlorosis in M5 variety of mulberry. Indian J. Seric. 35(1), 9-12.
- GHOSH A., AMBIKA P. K., MISHRA R. K. (1997) Effect of varieties, spacing and fertilizer doses on growth, yield and quality of mulberry. Indian J. Seric. 36(2), 138-141.
- JOLLY M. S. (1987) Appropriate Sericulture Techniques. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India pp. 175.
- MENGEL K., KIRKBY E. A. (1978) Principles of Plant Nutrition, 4th Ed. International Potash Institute Bern, Switzerland, pp. 687.
- RAVIKUMAR C., ESHWARARAO M. S., VEERESH M. (1991) The D. D. variety stands out among the promising indigenous clonal selections of mulberry. Indian Silk. 30(2), 10-15.
- TANDON H. L. S. (1989) Sulphur fertilizers for Indian Agriculture – A guide book. Fertilizer development and consultation organisation, New Delhi, pp 95.

ABSORPTION DU SOUFRE CHEZ TROIS VARIETES DE MURIER (*MORUS INDICA* L.) EN CULTURE IRRIGUEE

R. M. SHIVAPRAKASH & U. D. BONGALE*

Karnataka State Sericulture Research & Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore – 62,
Karnataka, Inde.

Les cultures ont besoin de soufre, en tant que nutriment secondaire de la plante, en quantités comparables à celles du phosphore. Les cultures qui produisent beaucoup de matières organiques ont en conséquence un besoin important en soufre. Nous avons réalisé une étude sur le terrain avec six combinaisons de traitements avec trois variétés (M5, S36 et Vishwa (DD), et deux densités de plantation (60×60 cm et 90×90cm). Les doses recommandées de NPK à raison de 300 : 120 : 120 kg / ha / année sont appliquées en cinq doses égales séparées pour tous les traitements. Nous présentons les observations enregistrées pour cinq récoltes de mûrier sur une année en données regroupées. La teneur en soufre de la feuille et de la tige varie respectivement de 0,14 à 0,16 % et de 0,06 à 0,07 %. Le soufre retiré par la feuille de mûrier est compris entre 14,20 et 19,77 kg / ha / année et par la tige entre 3,29 et 6,43 kg / ha / année. Le retrait total de soufre par la pousse de mûrier (feuille + tige) est donc compris entre 17,76 et 27,35 kg / ha / année. Ces observations montrent qu'il faut un complément de soufre à hauteur d'environ 20 à 25 kg de soufre / ha / année dans la culture du mûrier d'après le bilan des nutriments.

INTRODUCTION

Les cultures ont habituellement besoin de soufre, en tant que nutriment secondaire essentiel de la plante, en quantités comparables à celles du phosphore. Le soufre faisant partie des acides aminés, de la cystéine et de la méthionine, il est essentiel pour la synthèse des protéines et est impliqué dans la formation de la chlorophylle (Tandon, 1991). La carence en soufre entraîne l'inhibition de la synthèse des protéines. Le besoin total en soufre de différentes cultures dépend de la production de biomasse totale et varie entre les espèces de cultures puisque les cultures avec une production élevée de matière organique ont un besoin élevé en soufre (Mengel et Kirkby, 1978). Le mûrier est une culture foliaire qui produit beaucoup de biomasse et on s'attache tout spécialement à produire de la feuille de bonne qualité pour répondre aux besoins qualitatifs de l'élevage du ver à soie. Il faut donc entreprendre des études systématiques sur la quantité de soufre retiré et sur les besoins réels en soufre de la culture du mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons réalisé une étude sur le terrain avec trois variétés de mûrier améliorées à savoir M5, S36 et Vishwa (DD) dans une mûraie établie au *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute*, à Bangalore de 1996 à 1997. Les échantillons de sol sont recueillis dans la mûraie expérimentale avant le début de l'étude suivant la méthode d'échantillonnage composite (Black, 1965) pour analyser l'état de fertilité du sol. Le sol est un terreau de type sablonneux avec un

* Auteur auquel adresser la correspondance.

pH de 7,8, 0,56 % de charbon organique, 22,75 kg / ha de phosphate disponible et 340 kg / ha de potassium disponible. On suit les pratiques culturales recommandées pour le mûrier irrigué avec un complément de NPK de l'ordre de 300 : 120 : 120 kg / ha / année (Jolly, 1987) avec une modification pour le phosphore et le potassium qui sont appliqués en cinq doses égales séparées. Le NPK est appliqué sous la forme d'un engrais complexe (15 : 15 : 15) et des quantités différentielles d'azote sont appliquées sous la forme d'urée. De plus, on applique la première dose de fumure (FYM) à raison de 10 tonnes / ha pour la première récolte et une deuxième dose de 10 tonnes / ha est appliquée pour la troisième récolte peu après la deuxième récolte. La fumure est appliquée entre les rangées après avoir fait de petites tranchées dans chaque parcelle et on la recouvre de terre. La mûraie est irriguée une fois par semaine pendant les périodes où il n'y a pas de pluies. L'expérience est réalisée selon une conception en blocs aléatoires (RCBD) avec six traitements comprenant chacun trois répétitions. La taille de la parcelle expérimentale est de 7,2×7,2 m avec 144 plants espacés de 60 × 60 cm ou 64 plants pour un espacement de 90 × 90 cm. Les traitements sont les suivants :

T1 : M5 avec un espacement des plants de 60 × 60 cm

T2 : M5 avec un espacement des plants de 90 × 90 cm

T3 : S36 avec un espacement des plants de 60 × 60 cm

T4 : S36 avec un espacement des plants de 90 × 90 cm

T5 : DD avec un espacement des plants de 60 × 60 cm

T6 : DD avec un espacement des plants de 90 × 90 cm

Les observations sur la teneur en eau de la feuille, sur la teneur en eau de la tige, sur le rendement en feuilles, le rendement en tiges et en pousses sont enregistrées au bout de 70 à 75 jours de croissance. On recueille les pousses pour les cinq récoltes qui couvrent un cycle annuel de culture. On recueille les échantillons de feuilles et de tiges de chaque micro-parcelle et on enregistre le poids frais. Les mêmes échantillons sont d'abord séchés à l'air chaud puis au four à 70° C et on enregistre le poids sec. Les échantillons de feuilles et de tiges sont réduits en poudre et utilisés pour l'estimation du soufre dans la feuille et dans la tige (Black, 1965). On procède à l'évaluation du rendement en feuilles, en tiges et en pousses en récoltant tous les plants dans chaque micro-parcelle (avec 100 plants et 30 plants respectivement pour les espacements de 60 × 60 et de 90 × 90 cm) en excluant les plants du bord et en calculant le rendement en kg / ha. D'après la teneur en soufre de la feuille et de la tige, on calcule la quantité de soufre retiré / ha avec les différents traitements sur la base de la matière sèche.

RESULTATS

Le rendement en feuilles de mûrier diffère de manière significative avec les cinq récoltes (Tableau I). On enregistre des différences marquées de rendement entre l'espacement plus rapproché (60 × 60 cm) et l'espacement plus large (90 × 90 cm). Parmi les variétés, on enregistre le rendement foliaire le plus élevé chez T3, suivi par T5 (54 596 et 51 129 kg / ha / année) tandis qu'on enregistre le rendement foliaire le plus faible avec la variété M5 par comparaison aux variétés DD et S36 qui sont égales l'une à l'autre. On observe une tendance similaire pour le rendement en tiges et en pousses puisqu'on enregistre les valeurs les plus élevées chez T3 et T5 (Tableaux II et III). Le rendement foliaire moyen / ha est compris entre 9 043 kg / ha chez T1 et 10 919 kg / ha chez T3 pour l'espacement le plus faible et de 5 648 kg / ha chez T2 à 8 602 kg / ha chez T6 pour l'espacement le plus grand.

La teneur en soufre de la feuille de mûrier ne diffère pas de manière significative entre toutes les récoltes sauf pour la quatrième récolte. Les valeurs moyennes sont comprises entre 0,14 % chez T3 et T4 et 0,16 % chez T5 (Tableau IV). La teneur en soufre de la tige de mûrier diffère de manière significative pour la quatrième et la cinquième récolte mais il n'y a pas eu de différence significative pour la première, la deuxième et la troisième récolte. Les valeurs moyennes montrent que la teneur en soufre dans les tiges de mûrier varie de 0,05 chez T6 à 0,07 % chez T1 (Tableau V).

On enregistre le retrait maximum de soufre par la feuille avec T5 (19,77 kg / ha / année) et le retrait minimum avec T2 (14,20 kg / ha / année) (Tableau VI). Le retrait de soufre par la tige varie de 3,29 kg / ha / année chez T4 à 6,43 kg / ha / année chez T5 (Tableau VII). Le retrait total de soufre par la pousse de mûrier (feuille + tige) est compris entre 17,76 kg / ha chez T4 à 27,35 kg / ha / année chez T3 et il est compris entre 3,55 à 5,47 kg / ha / récolte (Tableau VIII).

DISCUSSION

On enregistre le rendement maximum en feuilles et en pousses chez T3 et T5 (avec respectivement les variétés S36 et Vishwa). Cela est en accord avec d'autres rapports similaires sur la supériorité de ces variétés (Ghosh et coll., 1997 ; Ravikumar et coll., 1991).

Dans cette étude, où on procède à la récolte de la pousse entière comme pour la méthode de nourrissage avec les pousses, le retrait total de soufre par hectare de mûraie est compris entre 14,20 et 19,77 kg pour la feuille et de 3,29 à 6,43 kg par la tige. La quantité de soufre absorbée par les cultures et les systèmes culturaux peut varier de quelques kg à 75 à 80 kg / ha / année en fonction de la culture, de l'intensité de culture et des niveaux de rendement (Tandon, 1989). Jusqu'à présent, l'application d'engrais contenant du soufre n'a pas été prise en compte dans les systèmes intégrés de culture du mûrier (Jolly, 1987) bien que la fumure soit une source indirecte de soufre. Mais la culture intensive continue du mûrier avec des variétés à haut rendement pourrait entraîner l'épuisement du soufre du sol. Le soufre faisant partie des acides aminés, de la cystéine et de la méthionine, il est essentiel pour la production des protéines dont le ver à soie a grandement besoin pour produire de bonnes récoltes de cocons. Il est de notoriété qu'un bon rendement en cocons est principalement influencé par l'état en nutriments de la feuille de mûrier (Bongale et Chaluvachari, 1993) qui à son tour dépend des pratiques de culture suivies pour les apports agronomiques. On sait que le rendement et la qualité du mûrier, surtout dans les zones de sériciculture intense, souffrent principalement à cause de la rareté des matières organiques dans le sol ce qui entraîne des insuffisances de teneur en soufre et de disponibilité en micro-nutriments dans le sol (Bongale et coll., 1996). Les observations de cette étude suggèrent donc qu'il faut systématiquement calculer le bilan du soufre retiré et ajouté dans la culture du mûrier.

Nous concluons dans cette étude que le retrait de soufre par la feuille et la tige de mûrier est compris respectivement entre 14,20 et 19,77 kg et entre 3,29 et 6,43 kg, ce qui nécessite un complément d'environ 20 à 25 kg de soufre par hectare par année.

SUSCEPTIBILITY OF CSR HYBRIDS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. TO TWO SPECIES OF *ASPERGILLUS* FUNGI

G. P. SINGH, T. SELVAKUMAR, S. D. SHARMA, B. NATARAJU & R. K. DATTA

Silkworm Pathology Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore – 570 008, India.

Susceptibility of newly evolved CSR hybrids of silkworm i. e. CSR2 × CSR4, CSR2 × CSR5, and the existing silkworm breeds i. e. NB4D2, Pure Mysore (PM), PM × NB4D2, to Aspergillus flavus Link and A. tamarii Kita were tested. The LD50 values of Aspergillus flavus and A. tamarii indicated that NB4D2 was the most susceptible and PM × NB4D2 the least susceptible to both of the Aspergillus species. CSR hybrids have shown an intermediate status of susceptibility to Aspergillus species. The 1st instar was more susceptible to Aspergillus than the 2nd and 3rd instars in all the silkworm breeds tested.

Keywords: *Bombyx mori*, susceptibility, aspergillosis.

INTRODUCTION

In general, the silkworm breeds or the breeds of different geographical origin do differ in the degree of susceptibility to pathogens. Acquired immunity in the silkworm to the fungi *Metarhizium anisoplae* (Metch) Sor. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. has been reported (Glaser, 1925; Paillot, 1930). Individual silkworm showed little immunity against the infection of *B. bassiana* (Steinhaus, 1949). Koidsumi (1957) demonstrated the presence of immunity to fungal infection in silkworm due to its cuticular lipids. The loss accrued due to various diseases in silkworm was higher in bivoltine breeds than in polyvoltines (Anonymous, 1975).

Aspergillosis caused by several species of *Aspergillus* fungi is one of the important group of infectious diseases of silkworm, *Bombyx mori* L. Israngkul and Sinchaisri (1973) screened several Japanese and Thai silkworm races for their susceptibility in early instars. Israngkul (1974) reported the difference in susceptibility of seven Japanese silkworm varieties against *Aspergillus* disease. Kawakami (1975) studied the difference in susceptibility of three Japanese and two Chinese silkworms, *B. mori* varieties to *Aspergillus flavus* infection. He observed that Chinese varieties were more resistant than Japanese varieties to *Aspergillus* infection. Chinnaswamy and Devaiah (1984), Narayanaswamy and Govindan (1989) studied the susceptibility of Indian silkworm breeds to *Aspergillus* infection. Information on susceptibility of Indian silkworm breeds to *Aspergillus* infection are limited. Currently, new silkworm breeds (CSR), which are promising for their best quality and quantity of silk, have been evolved and are being exploited in the field under the guidance of Japanese experts (Japan International Co-operation Agency project). Hence, the present study was undertaken to determine the susceptibility of hybrids of these breeds in comparison to the other popular silkworm breeds against two species of *Aspergillus* fungi.

MATERIALS AND METHODS

Newly evolved hybrids of CSR series, i.e. CSR2 × CSR4 and CSR2 × CSR5, one popular bivoltine breed NB4D2, one polyvoltine breed PM and one cross breed of polyvoltine and bivoltine i.e. PM × NB4D2 were selected to study their comparative susceptibility to two species of *Aspergillus* fungi i.e. *Aspergillus flavus* Link. and *A. tamarii* Kita. Conidial suspension of *Aspergillus* was prepared in distilled and sterilised water and the concentration of the conidia per ml. was calculated by using haemocytometer. Newly hatched and newly moulted 2nd and 3rd instar larvae were inoculated topically by spraying the conidial suspension (1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 and 1×10^2) of *Aspergillus* fungi on to the integument with the help of an atomizer. Two ml of conidial suspension prepared from seven days old culture was used to infect 100 larvae. The experiment was conducted three times and three replications of each variety of silkworms for *Aspergillus flavus* and *A. tamarii* infection were maintained separately. One hundred worms in each replication were used for the observations. The silkworms were reared on mulberry leaves under optimum temperature $28 \pm 1^\circ \text{C}$ and relative humidity 85-90% as advocated by Krishnaswami (1979). Larval mortality due to infection of respective *Aspergillus* species was recorded for 10 days after inoculation and cumulative mortality was used for probit analysis. LD₅₀ values obtained in three rearing were converted in square root transformation and further statistically analysed using Completely Randomized Design (Davis, 1967) to study the significant differences in susceptibility of silkworm breeds to *Aspergillus* fungi.

RESULTS

Susceptibility of silkworm breeds to *Aspergillus flavus*:

LD₅₀ values of *Aspergillus flavus* to different silkworm breeds are presented in Table I. When the newly hatched worms were infected with different density of conidia of *Aspergillus flavus*, NB4D2 has shown the highest susceptibility in the first instar showing lowest LD₅₀ value (0.96×10^4). Whereas PM × NB4D2 was the least susceptible, followed by PM as evident by high LD₅₀ values (4.60×10^4 and 2.22×10^4 respectively). CSR2 × CSR5 and CSR2 × CSR4 exhibited the intermediate status of susceptibility possessing the LD₅₀ values of 1.78×10^4 and 2.01×10^4 respectively. Similar pattern was recorded when the larvae were infected with *Aspergillus flavus* just after 1st and 2nd moult. The range of LD₅₀ value in 2nd instar was recorded for 3.87×10^5 to 8.70×10^5 and in 3rd instar 1.11×10^7 to 3.82×10^8 .

Results show that 1st instar larvae were more susceptible to *Aspergillus flavus* infection than 2nd and 3rd instars in all the breeds and hybrids tested. The LD₅₀ values showed that bivoltine pure races and hybrids were comparatively more susceptible than pure polyvoltine and cross breed of polyvoltine and bivoltine to *Aspergillus flavus*.

Susceptibility of silkworm breeds to *Aspergillus tamarii*:

The LD₅₀ value of *A. tamarii* to 1st, 2nd and 3rd instars of silkworm breeds and hybrids are presented in Table II. The pattern of susceptibility status of all silkworm breeds tested to *A. tamarii* was almost similar to *A. flavus*. The LD₅₀ values of different silkworm breeds ranged between 5.70×10^4 to 2.66×10^5 , 1.08×10^6 to 5.80×10^6 and 4.23×10^7 to 2.19×10^8 in 1st, 2nd and 3rd instars respectively. However, the LD₅₀ values of *A. tamarii* were comparatively higher than LD₅₀ values of *A. flavus*, which indicates that *A. flavus* is more virulent to silkworm breeds when compared to *A. tamarii* (Tables I and II).

Table I. LD₅₀ values of *A. flavus* to different silkworm, *Bombyx mori* L. breeds.Tableau I. Valeurs DL₅₀ avec *A. flavus* chez différentes lignées de ver à soie *Bombyx mori*.

Breeds	LD ₅₀ values		
	1 st instar	2 nd instar	3 rd instar
Lignées	Valeurs DL ₅₀		
	1 ^{er} âge	2 ^{ème} âge	3 ^{ème} âge
NB4D2	0.96×10^4 (9.168)	3.87×10^5 (12.865)	1.11×10^7 (16.219)
PM	2.22×10^4 (10.008)	8.20×10^5 (13.629)	1.54×10^8 (18.581)
PM × NB4D2	4.60×10^4 (10.736)	8.70×10^5 (13.676)	3.82×10^8 (19.656)
CSR2 × 5	1.78×10^4 (9.786)	4.16×10^5 (12.938)	1.18 ± 10^7 (16.282)
CSR2 × 4	2.01×10^4 (9.908)	5.27×10^5 (13.174)	1.27×10^7 (16.355)
SE	0.023	0.014	0.067
M. S.	0.942	0.431	0.175
CD 5%	0.072*	0.044*	0.052*

Figures in brackets are log transformed values / Les chiffres entre parenthèses sont les valeurs logarithmiques transformées

DISCUSSION

The silkworm breeds tested in the present study have shown a varied degree of susceptibilities to the infection of *Aspergillus flavus* and *A. tamarii*. The silkworms of multivoltine and cross breeds were less susceptible to *Aspergillus* infection than bivoltine and bivoltine hybrids. Above findings are in agreement with the study of Israngkul (1974) who has stated that polyvoltine strains were less susceptible than bivoltine strains to *A. flavus*. Similar observations have been made by Chinnaswamy and Devaiah (1984) where KA (Chinese bivoltine) was highly susceptible and PM (Indian polyvoltine) was less susceptible to *A. tamarii*. Narayanaswamy and Govindan (1989) reported that multivoltines were less susceptible than bivoltines to the infection of *Aspergillus flavus*. NB4D2 was the most susceptible in present study. This result was confirmed by the earlier work of Bhagyalakshmi (1994) where she reported NB4D2 as most susceptible to *Aspergillus* infection among six bivoltine and six polyvoltine races.

Present study indicates that among the instar susceptibility to *A. flavus* and *A. tamarii*, the 1st instar was found more susceptible than the 2nd and 3rd instars in all the breeds tested. These results are more or less similar to those of Aoki (1971) who reported that susceptibility of the silkworm to *Aspergillus* varies with the larval instar and he observed that 1st instar larvae were highly susceptible (100% mortality) to *Aspergillus* and less in 3rd and 4th instars. Similarly Kawakami and Mikuni (1973) reported that the virulence of *A. flavus* was highest on first day old first instar larvae and it decreases

with the lapse of time. The LD₅₀ value for the 1st instar was less than 1.7 ± 10^2 which increases with the age of larvae. This trend of reduction in susceptibility with the advancement in age is comparable with the pathogenicity of *A. tamaraii* on *Dasychira mendosa* a lepidopteran insect (Chinnaswamy *et al.*, 1986).

Table II. LD₅₀ values of *A. tamaraii* to different silkworm, *Bombyx mori* L. breeds.

Tableau II. Valeurs DL₅₀ avec *A. tamaraii* pour différentes lignées de ver à soie *Bombyx mori*.

Breeds / Lignées	LD50 Values / Valeurs DL50		
	1 st Instar 1er âge	2 nd Instar 2ème âge	3 rd Instar 3ème âge
NB4D2	5.70×10^4 (10.947)	1.08×10^6 (13.891)	4.23×10^7 (17.560)
PM	1.85×10^5 (12.128)	4.06×10^6 (15.216)	1.14×10^8 (18.548)
PM × NB4D2	2.66×10^5 (12.491)	5.80×10^6 (15.573)	2.19×10^8 (19.302)
CSR2 × 5	8.00×10^4 (11.286)	1.50×10^6 (14.291)	5.30×10^7 (17.792)
CSR2 × 4	9.80×10^4 (11.491)	1.92×10^6 (14.467)	7.60×10^7 (18.146)
S. E.	0.045	0.031	0.033
M. S.	1.188	1.474	1.271
CD 5%	0.144*	0.099**	0.105*

Figures in brackets are log transformed values / Les chiffres entre parenthèses sont des valeurs logarithmiques transformées.

* = Significant / Significatif.

All silkworm breeds tested in present study, have shown comparatively higher susceptibility to the infection of *A. flavus* than *A. tamaraii*. However, the studies made by two different authors Chinnaswamy and Devaiah (1984) on *A. tamaraii* and Narayanaswamy and Govindan (1989) on *A. flavus*, are different in their findings on susceptibility status of the silkworm to the two species of *Aspergillus*. The mortality percent for *A. tamaraii* is higher than *A. flavus*. The difference in susceptibility to *A. tamaraii* and *A. flavus* in the present study may be due to the strain difference of the fungus and the rearing environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Mrs Rekha, M., Senior Research Officer (Statistics), Computer Section, Central Sericultural Research and Training, Mysore – 570 008 for statistical analysis of the data and Mr Suresh Rai, Assistant Director (Statistics), Statistics Section, Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi – 835 303 for statistical guidelines and interpretation of scientific data.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1975) Field survey of incidence of various silkworm diseases in Channapatana and Kolar areas of Karnataka state. Ann. Report, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore; p. 89-92.
- AOKI K. (1971) Silkworm diseases in Thailand. Bull. Thai Seric. Res. Training Inst., 1, 102-108.
- BHAGYALAKSHMI T. A. (1994) Host range and strain virulence of *Aspergillus tamarii* Kita and its pathogenicity to different races of *Bombyx mori* L., M. Sc. (Seric.) Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore, India, pp. 86.
- CHINNASWAMY K. P. & DEVAIAH M. C. (1984) Susceptibility of different races of silkworm *Bombyx mori* L. Aspergillosis caused by *Aspergillus tamarii* Kita. Sericologia, 24(4), 513-517.
- CHINNASWAMY K. P., REDDY D. N. R., GOVINDAN R. & NARAYANASWAMY T. K. (1986) Pathogenicity of *Aspergillus tamarii* Kita to *Dysichira mendosa* Hubner (Lepidoptera : Lymantriidae), a pest of mulberry. Entomon, 11, 67-68.
- DAVIS O. L. (1967) Designed Analysis of Industrial experiments. Oliver and Boyd, London, p. 145-198.
- GLASER R. W. (1925) Acquired immunity in silkworm, J. Immunolog., 10, 651-662.
- ISRANGKUL L. (1974) Varietal resistance of silkworm to *Aspergillus* disease. Bull. Thai. Seric. Res. Trg. Inst. 4, 113.
- ISRANGKUL L. & SINCHASRI N (1973) Varietal resistance of silkworm to *Aspergillus* disease. Bull. Thai. Seric. Res. Trg. Inst., 3, 113-115.
- KAWAKAMI K. (1975) Susceptibility of several varieties of the silkworm, *Bombyx mori* L. to *Aspergillus* disease and germination of fungus spores in larval haemolymph. J. Seric. Sci. Jpn, 44, 39-44.
- KAWAKAMI K. & MIKUNI T. (1973) Studies on the causative fungi of *Aspergillus* disease of the silkworm larvae II. Resistance to mercuric fungicides and susceptibility in each larval stage of the silkworm to the infection of *Aspergillus* isolates collected from co-operative rearing houses of young silkworm larvae. Bull. Seric. Expt. Stn., 26, 58-77.
- KOIDSUMI K. (1957) Antifungal action of cuticular lipids in insects. J. Insect Physiol., 1, 40-41.
- KRISHANASWAMI S. (1979) Improved method of rearing young age silkworms., Bull. No. 3, Central Silk Board, Bangalore, pp. 24.
- NARAYANASWAMY T. K. & GOVINDAN R. (1989) Comparative susceptibility of some breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. to *Aspergillus flavus* Link. Sericologia, 29(1), 33-37.
- PAILLOT A. (1930) Triatedes maladies du ver à soie, G. Doin et Cie, Paris, p.279.
- STEINHAUS E. A. (1949) Principles of Insect Pathology, McGraw Hill Book Co. Inc., New York, p.757.

SENSIBILITE DES VERS A SOIE HYBRIDES *BOMBYX MORI* L. DU CSR A DEUX ESPECES DE CHAMPIGNONS *ASPERGILLUS*

G. P. SINGH, T. SELVAKUMAR, S. D. SHARMA, B. NATARAJU & R. K. DATTA

Silkworm Pathology Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore – 570 008, Inde.

*Nous avons testé la sensibilité d'hybrides du CSR nouvellement mis au point, CSR2 × CSR4, CSR2 × CSR5 et de lignées de vers à soie existantes, NB4D2, Pure Mysore (PM) × NB4D2 à *Aspergillus flavus* Link et *A. tamarii* Kita. Les valeurs DL50 pour *Aspergillus flavus* Link et pour *A. tamarii* indiquent que NB4D2 est la plus sensible et que PM × NB4D2 est la moins sensible aux deux espèces d'*Aspergillus*. Les hybrides du CSR présentent une sensibilité intermédiaire aux espèces *Aspergillus*. Le 1^{er} âge est plus sensible à *Aspergillus* que les 2^{ème} et 3^{ème} âges chez toutes les lignées de vers à soie testées.*

INTRODUCTION

En général, les lignées de vers à soie ou les lignées d'origine géographique diverses diffèrent de par leur degré de sensibilité aux pathogènes. On a signalé une immunité acquise du ver à soie aux champignons *Metarhizium anisoplae* (Metch.) Sor. et *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Glaser, 1925 ; Paillot, 1930). Un ver à soie isolé présente peu d'immunité à l'infestation par *B. bassiana* (Steinhaus, 1949). Koidsumi (1957) a démontré que l'immunité du ver à soie à l'infestation fongique était liée aux lipides cuticulaires. Chez le ver à soie, les pertes dues à des maladies variées sont plus élevées chez les lignées bivoltines que chez les polyvoltines (Anonyme, 1975).

L'aspergillose provoquée par plusieurs espèces du champignon *Aspergillus* est l'un des groupes importants de maladies infectieuses du ver à soie, *Bombyx mori* L. Israngkul et Sinchaisri (1973) ont passé en revue plusieurs races de vers à soie japonaises et thaïlandaises pour évaluer leur sensibilité aux premiers âges. Israngkul (1974) a signalé une différence de sensibilité à la maladie *Aspergillus* chez sept variétés de vers à soie japonaises. Kawakami (1975) a étudié la différence de sensibilité de trois variétés japonaises et de deux variétés chinoises du ver à soie *B. mori* L. à l'infestation par *Aspergillus flavus*. Il a observé que les variétés chinoises sont plus résistantes que les variétés japonaises à l'infestation par *Aspergillus*. Chinnaswamy et Devaiah (1984), Narayanaswamy et Govindan (1989) ont étudié la sensibilité de lignées de vers à soie indiennes à l'infestation par *Aspergillus*. L'information sur la sensibilité des lignées de vers à soie indiennes à l'infestation par *Aspergillus* est limitée. Actuellement, on a mis au point et on exploite sur le terrain sous les conseils d'experts japonais (*Japan International Co-operation Agency Project*) de nouvelles lignées de vers à soie (CSR) qui sont prometteuses pour la qualité et la quantité de soie. Nous avons donc entrepris cette étude pour comparer la sensibilité d'hybrides de ces lignées et d'autres lignées de vers à soie populaires à deux espèces de champignons d'*Aspergillus*.

MATERIELS ET METHODES

Les hybrides nouvellement mis au point de la série CSR, c'est à dire CSR2×CSR4 et CSR2 × CSR5, une lignée bivoltine populaire NB4D2, une lignée polyvoltine PM et un croisement de polyvoltin et bivoltin, c'est à dire PM × NB4D2 sont sélectionnés pour étudier leur sensibilité comparative à deux espèces de champignons *Aspergillus*, c'est à dire à *Aspergillus flavus* Link et à *A. tamarii* Kita. On prépare la suspension conidiale d'*Aspergillus* dans de l'eau distillée et stérilisée et on calcule la concentration des conidies par ml en utilisant un hémocytomètre. Les larves venant d'éclore et de muer des 2^{ème} et 3^{ème} âge sont inoculées en vaporisant la suspension conidiale des champignons d'*Aspergillus* de manière topique (1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 et 1×10^2). Deux ml de suspension conidiale préparée à partir de cultures de sept jours sont utilisés pour infester 100 larves. On réalise l'expérience trois fois et on conserve séparément trois répétitions pour chaque variété de vers à soie pour l'infestation par *Aspergillus flavus* et par *A. tamarii*. On utilise cent vers de chaque répétition pour les observations. Les vers à soie sont élevés sur des feuilles de mûrier à une température optimum de $28 \pm 1^\circ \text{C}$ et avec une humidité relative de 85 à 90% d'après les recommandations de Krishnaswami (1979). On enregistre la mortalité larvaire due à l'infestation par les espèces respectives d'*Aspergillus* pendant 10 jours après l'inoculation et on utilise la mortalité cumulative pour l'analyse de probit. On convertit les valeurs DL₅₀ obtenues pour trois élevages en racine carrée et on les analyse à nouveau de manière statistique en utilisant une Conception Aléatoire Complète (Davis, 1967) pour étudier les différences significatives de sensibilité des lignées de vers à soie aux champignons *Aspergillus*.

RESULTATS

Sensibilité des lignées de ver à soie à *Aspergillus flavus* :

Les valeurs DL₅₀ de différentes lignées de vers à soie face à *Aspergillus flavus* sont présentées dans le Tableau I. Quand les vers à soie qui viennent d'éclore sont infestés par une densité différente de conidies d'*Aspergillus flavus*, NB4D2 présente la sensibilité la plus élevée au premier âge avec la valeur DL₅₀ la plus faible ($0,96 \times 10^4$). Tandis que PM × NB4D2 est la moins sensible, suivi par PM comme le montrent les valeurs DL₅₀ élevées (respectivement $4,60 \times 10^4$ et $2,22 \times 10^4$). CSR2×CSR5 et CSR2×CSR4 présentent une sensibilité intermédiaire avec des valeurs DL₅₀ de respectivement $1,78 \times 10^4$ et $2,01 \times 10^4$. On observe un schéma similaire lors de l'infestation des larves par *Aspergillus flavus* juste après la 1^{ère} et la 2^{ème} mue. Les valeurs DL₅₀ pour le 2^{ème} âge sont comprises entre $3,87 \times 10^5$ et $8,70 \times 10^5$ et pour le 3^{ème} âge entre $1,11 \times 10^7$ et $3,82 \times 10^8$.

Les résultats montrent que les larves du 1^{er} âge sont plus sensibles à l'infestation par *Aspergillus flavus* que les 2^{ème} et 3^{ème} âges chez toutes les lignées et les hybrides testés. Les valeurs DL₅₀ montrent que les races bivoltines pures et les hybrides sont comparativement plus sensibles à *Aspergillus flavus* que les races polyvoltines pures et les croisements de polyvoltins et de bivoltins.

Sensibilité des lignées de vers à soie à *Aspergillus tamarii* :

Les valeurs DL₅₀ pour *A. tamarii* chez les lignées et les hybrides de vers à soie aux 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} âges sont présentées dans le Tableau II. Le degré de sensibilité à *A. tamarii* est presque similaire à celui pour *A. flavus* pour toutes les lignées de vers à soie testées. Les valeurs DL₅₀ des différentes lignées de vers à soie sont comprises respectivement pour les 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} âges entre $5,70 \times 10^4$ et $2,66 \times 10^5$, $1,08 \times 10^6$ et $5,80 \times 10^6$ et entre $4,23 \times 10^7$ et $2,19 \times 10^8$. Cependant, les valeurs DL₅₀ pour *A. tamarii* sont comparativement plus élevées que les valeurs DL₅₀ pour *A. flavus*, ce qui indique qu'*A. flavus* est plus virulent qu'*A. tamarii* chez les lignées de vers à soie (Tableaux I et II).

DISCUSSION

Les lignées de vers à soie testées dans cette étude présentent un degré varié de sensibilité à l'infestation par *Aspergillus flavus* et *A. tamarii*. Les vers à soie des lignées polyvoltines et les croisements sont moins sensibles à l'infestation par *Aspergillus* que les bivoltins et les hybrides bivoltins. Ces observations sont en accord avec l'étude d'Israngkul (1974) qui a observé que les souches polyvoltines sont moins sensibles que les souches bivoltines à *A. flavus*. Chinnaswamy et Devaiah ont fait des observations similaires (1984) : KA (bivoltin chinois) est très sensible et PM (polyvoltin indien) est moins sensible à *A. tamarii*. Narayanaswamy et Govindan (1989) ont rapporté que les polyvoltins sont moins sensibles que les bivoltins à l'infestation par *Aspergillus flavus*. NB4D2 est la plus sensible dans cette étude. Ce résultat est confirmé par les précédents travaux de Bhagyalakshmi (1994) où elle a rapporté que, sur six races bivoltines et polyvoltines, NB4D2 est la plus sensible à l'infestation par *Aspergillus*.

En ce qui concerne la sensibilité à *A. flavus* et à *A. tamarii* en fonction des âges, cette étude indique que chez toutes les lignées testées, le 1^{er} âge est plus sensible que les 2^{ème} et 3^{ème} âges. Ces résultats sont plus ou moins similaires à ceux d'Aoki (1971) qui a rapporté que la sensibilité du ver à soie à *Aspergillus* varie en fonction de l'âge larvaire et qui a observé que les larves du 1^{er} âge sont très sensibles (100 % de mortalité) à *Aspergillus* et qu'elles le sont moins aux 3^{ème} et 4^{ème} âges. De même, Kawakami et Mikuni (1973) ont rapporté que la virulence d'*A. flavus* est plus élevée chez les larves d'un jour du 1^{er} âge et qu'elle baisse au cours du temps. La valeur DL50 pour le 1^{er} âge est inférieure à $1,7 \times 10^2$ et elle augmente avec l'âge de la larve. Cette tendance à la diminution de la sensibilité avec l'âge est comparable à la pathogénicité d'*A. tamarii* chez *Dasychira mendosa*, un insecte lépidoptère (Chinnaswamy et coll., 1986).

Toutes les lignées de vers à soie testées dans cette étude sont comparativement plus sensibles à l'infestation par *A. flavus* qu'à celle par *A. tamarii*. Cependant, les études réalisées par deux auteurs différents, Chinnaswamy et Devaiah (1984) sur *A. tamarii* et par Narayanaswamy et Govindan (1989) sur *A. flavus*, ont abouti à des observations différentes concernant la sensibilité du ver à soie aux deux espèces d'*Aspergillus*. Le pourcentage de mortalité est plus élevé pour *A. tamarii* que pour *A. flavus*. La différence de sensibilité à *A. tamarii* et à *A. flavus* dans notre étude pourrait être due à une souche différente de champignon et à l'environnement d'élevage.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

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

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

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

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

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

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

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

- Remerciements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

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

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

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.

- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

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

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

- Acknowledgements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

