

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*)
BOSQUET G. (France)
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)
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*)
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*)
MACHII H. (Japon / *Japan*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
MIRANDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TAKEDA S. (Japon / *Japan*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)

DEVELOPMENT OF SILK COCOON QUALITY INDEX THROUGH DISCRIMINANT ANALYSIS

B. V. VASUMATHI¹, T. H. SOMASHEKAR¹, M. H. BALASUBRAHMANYA² & K. N. KRISHNASWAMY*

1. Central Silk Technological Research Institute, Bangalore, India.

2. Department of Management Studies, Indian Institute of Science, Bangalore, India.

*This paper reports on the application of discriminant analysis as a means of developing quality index for silk cocoons, which in turn becomes important in establishing market value. Cocoons, the output of the on-farm sector are the input for the reeling industry, which produces the raw silk. Cocoon quality plays a decisive role in the reeling performance and quality of raw silk. Cocoon quality is governed by several parameters, each of them being associated with a certain level of importance. It is important to represent them as a unique value or to say an index by giving appropriate weightage to the individual quality variables, which has been defined as Cocoon Quality Index (CQI). CQI is a numerical measure or an expression of the totality of its quality features. The statistical technique chosen for developing the CQI is discriminant analysis. The **discriminating criteria** were set as Shell Ratio % and Defective Cocoon % and each of them was grouped into three categories based on its importance during reeling and quality of raw silk. The discriminant function was found to be efficient in classifying the cocoons into three quality groups representing the unique quality index and the cut off values for grouping them into low, medium and high quality. The expression for calculating the CQI of bivoltine cocoons and multibi cocoons were arrived at.*

Keywords: Cocoon quality index, discriminant analysis, shell ratio, defective cocoon percentage, bivoltine cocoons and multibi cocoons.

INTRODUCTION

Cocoons, the output of the on-farm sector are the input for the reeling industry, which produces the raw silk. Cocoon quality contributes to the tune of 80% towards raw silk quality and productivity [Shimazaki, (1964)]. Further, cocoons as raw material have a significant bearing on the reeling industry since it constitutes 85-90% of the cost of production of raw silk [Sonwalkar, (1993)]. Cocoon quality plays a decisive role in the reeling performance and quality of raw silk. The quality of cocoons has a significant impact on the yield of raw silk, which is expressed in terms of renditta (number of kg of cocoons needed to reel one kg of raw silk) and quality of raw silk reeled and reeling filature efficiency [Hariraj, (1994)].

In spite of India being a large producer of raw silk, cocoons are transacted without testing and price is purely based on the subjective assessment of quality made by the buyer at the time of purchase. There is neither a system for scientific assessment of the quality of cocoons prior to transaction nor a systematic approach for fixing the price based on their quality and market conditions.

However, some form or the other of quality index as a measure of cocoon quality exists in sericulturally advanced countries especially Japan and China [Somashekar, (1999) and Nakajima

* Retd Professor, Department of Management Studies, Indian Institute of Science, Bangalore, India.

(1999)]. Cocoon testing prior to transaction is mandatory in these two countries and cocoon price is fixed on the basis of its quality and the raw silk price that is fixed in advance for the entire year.

Further, what are available as national standards in other sericultural countries cannot be adopted as such in the Indian context (Vasumathi, 2000). Therefore, there is an urgent need for developing an objective method for assessing the quality of cocoons based on the parameters so that an organizational mechanism for cocoon transactions can be set up.

This paper presents the details of the study on the development of cocoon quality index as a measure of cocoon quality with the case study of India and the concept can be extended to any other specific location and/or textile material. First, the cocoon quality parameters and quality index are discussed and then the study and its results are presented before conclusion.

1. Cocoon Quality Parameters:

Cocoon quality is governed by several parameters, each of them being associated with a certain level of importance [Anon, (1996)]. The important quality parameters are (1) Shell Ratio percentage (SR%), (2) Defective Cocoon Percentage (DC%), (3) Average Filament Length (AFL), (4) Average Non Broken Filament Length (NBFL), (5) Single Cocoon Filament Denier (SCFD) and (6) reelability percentage. Of these, SR% and DC% have been identified as the most significant ones [Sonwalkar, (1982)]. They have a greater bearing on the reeling efficiency as well as yarn quality and at the same time are relatively easy to determine requiring minimum facilities, infrastructure and time.

Each of the quality parameters has its own relative significance on the reeling efficiency and raw silk quality. The procedures for assessment of a few of these parameters are quite involved, while it is relatively easy for a few others. A few tests are non destructive (as in the case of DC%), while a few are destructive (as in the case of SR%). Thus, each of the parameters is associated with a certain extent of ease or difficulty in assessment.

2. Relevance of Quality Index:

Quality is an important aspect more so in the case of raw material in deciding the quality of the end product. When there are multiple measures of quality, it becomes important to represent them as a unique value or to say an index by giving appropriate weightage to the individual quality variables.

Ladd and Martin (1976) highlight the importance of using a single index of representing quality. An example of a carload of corn, which is tested for five different quality characteristics is given and a specified-order method of describing this corn quality (i.e., characteristic grading) recommended.

Naik G. & Asopa (1993) observed that when there are multiple characteristics affecting quality as in the case of raw silk, a finite number (often small) of grades are set based on ranges of values of characteristics. This, they say facilitates quality-price linkages.

Nakajima (1999) stated that in order to produce high quality raw silk, it is necessary to produce good cocoons and reel the silk by a good technique. He felt that it is necessary to carry out minimum possible testing before transaction of cocoons as well as raw silk. In case of cocoons he proposed the measurement of SR% and DC% as the basis for transaction.

Yamamoto (1999) pointed out that the quality of cocoons needs to be reflected in the market price and thus cocoon testing system should be introduced following two methods for measuring cocoon quality and fixation of cocoon price. He advocated measurement of good cocoon percentage (complement of defective cocoon percentage) and shell ratio percentage.

It is therefore essential to have such a measure for purposes of comparing quality of two or more lots or grading of different lots of cocoons. Succinctly, Cocoon Quality Index (CQI) can be defined as a numerical measure or an expression of the totality of its quality features.

The objective of the study is to develop an index for cocoon quality in respect of bivoltine and multivoltine hybrid (multibi) cocoons and facilitate their classification into three distinct quality groups, which in turn would help in estimating the market value during transaction.

METHODOLOGY

The method consisted of the following steps:

- (1) A set of parameters defining cocoon quality were short listed.
- (2) The more important parameters influencing renditta, which is a measure of cocoon quality were extracted.
- (3) Discriminant analysis was made using the extracted parameters, by categorizing the data into three groups i. e., low, medium and high quality.
- (4) Analyses were carried out separately for bivoltine and multibi cocoons.
- (5) Discriminant function was arrived at, to represent the quality index with cocoon quality parameters as independent variables.
- (6) Validation of the results of the discriminant analysis

1. Data and Sample:

Bivoltine Cocoons:

Bivoltine cocoons production has been relatively new to India as compared to multibi cocoons. However, owing to their superior quality, major thrust is being given to bivoltine silk production, which, as of now is less than 5% of the total cocoon production. Data in respect of CSR race bivoltine cocoons collected from the farmers and tested at Central Silk Technological Research Institute (CSTRI), for a period of four years were collected for the analysis. Data in respect of around 600 cocoon lots thus tested formed the input for the discriminant analysis. The variables included SR%, DC%, AFL, NBFL, SCFD and Reelability. With all the cocoon quality parameters included in the discriminant analysis, the more significant ones get entered in the expression for CQI.

Multibivoltine Cocoons:

Field data on cocoon quality from five grade I cocoon markets in Karnataka state in India (i. e., Ramanagaram, Siddlaghatta, Vijayapura, Kolar and Kollegal) were collected for a period of two years from July 1996 to June 1998. On any given day there were a minimum of around 100 lots of cocoons representing the cocoon transaction across the state. Here the data comprised only SR% and DC%.

2. Data Analysis:

A linear regression analysis was made with all the cocoon quality parameters as independent variables and renditta as the dependent variable in order to ascertain the importance of SR% and DC% in explaining the variability in reeling performance measured in terms of renditta. Data available at CSTRI was used for the purpose. SR%, DC% and AFL were the three variables that got entered in the equation, explaining the variability in renditta.

Discriminant analysis was used in order to classify the cocoon lots by a set of independent variables into three mutually exclusive and exhaustive groups. [Morrison (1969)]. In discriminant analysis, a linear combination of the independent variables is formed and serves as the basis of assigning cases to groups. Thus, information contained in multiple independent variables is summarised in a single index, which serves the purpose of CQI.

The **discriminating criteria** were set as SR% and DC% and each of them was grouped into three categories (low, medium and high qualities) based on its importance during reeling and quality of raw silk. The cocoon parameters that would result in very good performance, average performance and below average performance during reeling, as viewed by experts was considered for the purpose.

The low, medium and high qualities in each of the parameter were given a ranking of 3, 2 and 1 respectively. The sum of the ranks of SR% and DC% was computed. A rank sum of 5 and 6 was taken as rank 3 (or low quality), rank sum of 4 was taken as rank 2 (or medium quality) and a rank sum of 2 and 3 was taken as rank 1 (or high quality).

Canonical discriminant analysis was run adopting stepwise method with Mahalanobis distance and the criteria chosen was with F value of 3.84 for entry and 2.71 for removal at 5% level of significance. Prior probabilities used were Fisher's and unstandardised. Group means were compared using Mahalanobis distance.

The method of Frank *et al.*, (1965) was used for validating the results of discriminant analysis. The existing data was partitioned into two subsets in the ratio of 75 and 25 for training and testing to perform validation. 25% of the cases were selected at random. Training subset comprising 75% of the data was used for performing discriminant function and for cross validating the model thus obtained, the testing subset comprising 25% of the data was used. [SPSS, (1999a)].

The assumptions about the data for a valid discriminant analysis are (1) the variables follow multivariate normal distribution and (2) the group variance, covariance matrices are equal.

RESULTS AND DISCUSSIONS

1. Discriminant functions:

The Eigen values for the canonical discriminant function are given in Tables I & II.

Table I. Eigen values of discriminant functions for bivoltine cocoons.

Tableau I. Valeurs propres des fonctions discriminantes pour les cocons bivoltins.

Function	Eigen Value	% of Variance	Cumulative %	Canonical correlation
Fonction	Valeur propre	% de variance	% cumulatif	Corrélation canonique
1	3.149 ^a	96.9	96.9	0.871
2	0.100 ^a	3.1	100.0	0.302

a. First 2 canonical discriminant functions were used in the analysis / Les 2 premières fonctions discriminantes sont utilisées dans l'analyse.

Table II. Eigen values of the discriminant functions for multibi cocoons.

Tableau II. Valeurs propres des fonctions discriminantes pour les cocons multibi.

Function	Eigen Value	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
Fonction	Valeur propre	% de variance	% cumulatif	Corrélation canonique
1	1.999 ^a	99.1	99.1	0.816
2	0.018 ^a	0.9	100.0	0.134

a. First 2 canonical discriminant functions were used in the analysis / Les deux premières fonctions discriminantes canoniques sont utilisées dans l'analyse.

In both the cases, the first discriminant function acts highly efficiently in separating the three groups. While both the functions significantly discriminate between the groups, the first function is more significant because it accounts for the largest proportion of the discriminant variance. The canonical correlation for a function is the square root of the ratio of between-groups to total sums of squares. When squared, it is the proportion of total variability explained by differences between groups. It measures the association between the discriminant scores and the groups.

Equality of Discriminant Functions was tested using Wilks' Lambda (proportion of the total variance in the discriminant scores not explained by differences among the groups). Lambda is used to test the null hypothesis that the means of all the variables across groups are equal and provides little information regarding the success of the model for classifying cases. As a test of its size, Lambda is transformed to a variable with an approximate Chi-Square distribution. The significance level of the observed Wilks' Lambda here is based on a Chi-Square transformation of the statistic. The value of Lambda and its associated Chi-Square value, the degrees of freedom and the significance level are given in Tables III & IV. It may be noted that the Chi-Square is indicating a highly significant difference between the group centroids. Thus, the null hypothesis that the means of both functions are equal in the three populations can be rejected in both the cases.

Table III. Wilks' Lambda of discriminant functions for bivoltine cocoons.

Tableau III. Lambda de Wilk des fonctions discriminantes pour les cocons bivoltins.

Test of function (s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
<i>Test de(s) fonction (s)</i>	<i>Lambda de Wilk</i>	<i>Chi carré</i>	<i>Degrés de liberté</i>	
1 through 2 / 1 vers 2	0.219	826.042	6	.000
2	0.909	52.038	2	.000

Table IV. Wilks' Lambda of discriminant functions for multibivoltine cocoons.

Tableau IV. Lambda de Wilk des fonctions discriminantes pour les cocons multibivoltins.

Test of function(s)	Wilks' Lambda	Chi-Square	df	Sig.
<i>Test des fonction(s)</i>	<i>Lambda de Wilk</i>	<i>Chi carré</i>	<i>Degrés de liberté</i>	
1 through 2 / 1 vers 2	0.327	33858.288	4	.000
2	0.982	551.088	1	.000

2. Contribution of SR% and DC% to discriminant functions:**Standardised Coefficient:**

The standardised coefficients assess the contribution of each variable to the discriminant function. The variables SR% and DC% do not appear to be much different in their contributions, while AFL in respect of bivoltine cocoons has a relatively smaller contribution. SR% and DC% largely explain the quality and it is reasonable that these two parameters are alone used for multibi cocoons. (Tables V & VI)

Table V. Standardised canonical discriminant function coefficient for bivoltine cocoons.**Tableau V. Coefficient de fonction discriminante standardisée pour les cocons bivoltins.**

	Function / Fonction	
	1	2
AFL	-0.164	-0.665
DC %	0.982	0.077
SR %	-0.689	0.983

Table VI. Standardised canonical discriminant function coefficient for multibi cocoons.**Tableau VI. Coefficient de fonction discriminante standardisée pour les cocons multibi.**

Variable	Function / Fonction	
	1	2
SR %	-0.786	0.686*
DC %	0.882	0.558*

Structure Matrix:

Structure matrix (a panel of within groups correlations of each predictor variable with the canonical variable) provides another way to study the usefulness of each variable in the discriminant function. When there are more than two groups (and more than two variables), within-group correlations are printed for each canonical variable, and variables with large correlations for a particular canonical variable are grouped together and marked with an asterisk. (Tables VII & VIII).

Table VII. Structure matrix for bivoltine cocoons.**Tableau VII. Matrice de structure pour les cocons bivoltins.**

Variable	Function / Fonction	
	1	2
DC%	0.703*	0.490
AFL	-0.431*	-0.306
NBFL ^a	-0.390*	-0.323
SR%	-0.347	0.771*
FLDEN ^a	0.060	0.210*
REEL ^a %	-0.117	-0.132*

a. This variable not used in the analysis / *Cette variable n'est pas utilisée dans l'analyse.*

* Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function / *Corrélation absolue la plus grande entre chaque variable et n'importe quelle fonction discriminante.*

Table VIII. Structure matrix for multibi cocoons.**Tableau VIII. Matrice de structure pour les cocons multibi.**

Variable	Function / Fonction	
	1	2
SR %	-0.535	0.845
DC %	0.657	0.754

Discriminant Function for Cocoon Quality Index:

Though all the quality parameters of cocoons were included in the analysis for developing CQI for bivoltine cocoons, the model however, picked up only three parameters i. e., SR%, DC% and AFL as the variables having significant bearing in discriminating cocoon quality into three groups as low, medium and high. Tables IX & X show the coefficients of the variables and the constant in the discriminant function arriving at the CQI for bivoltine cocoons and multibi cocoons respectively. The signs of the coefficients are arbitrary and separation among the groups would be the same, if each coefficient is multiplied by (-1).

Table IX. Unstandardised coefficients of discriminant functions for bivoltine cocoons.*Tableau IX. Coefficients non standardisés des fonctions discriminantes pour les cocons bivoltins.*

	Function / Fonction	
	1	2
AFL	-0.003	-0.010
DC %	0.186	0.015
SR %	-0.618	0.882
Constant / Constante	13.868	-10.634

Table X. Unstandardised coefficients of discriminant functions for multibi cocoons.*Tableau X. Coefficients non standardisés des fonctions discriminantes pour les cocons multibi.*

Parameters / Paramètres	Function / Fonction	
	1	2
SR %	-0.682	0.595
DC %	0.414	0.262
Constant / Constante	8.850	-12.240

Group Centroid Means:

Within-group means are computed for each canonical variable. In the case of bivoltine cocoons, the canonical variable score or the average discriminant score for group 1 is -2.103, for group 2 it is -0.348 and 2.421 for group 3. In the case of multibi cocoons, the canonical variable score or the average discriminant score for group 1 is -1.152, for group 2 it is 0.934 and 2.380 for group 3. These scores represent the mean values of the three ranks of cocoons namely high, medium and low respectively. The cut off values for the three ranks are derived as the midpoint of two consecutive centroid means.

Percentage Classification:

Case wise group membership is computed and the actual group membership is compared to its membership as predicted by the discriminant analysis. Estimates of the classification function coefficient are used to compute a score for each group and then classify into a particular group. Posterior probabilities indicate how likely each case is of being a member of each group. One way to compute these probabilities for each case is to first compute the Mahalanobis distance (D^2) to each group mean from the case and then compute the ratio of $\exp(-D^2)$ for the group over the sum of $\exp(-D^2)$ for all groups (Tables XI & XII).

Table XI. Percentage classification results for bivoltine cocoons.**Tableau XI. Résultats du pourcentage de classification pour les cocons bivoltins.**

		Predicted Group membership % % d'appartenance supposée au groupe			
	Rank / Rang	1	2	3	Total
Original	1	78.5	21.5	0	100
	2	8.1	82.9	9.0	100
	3	0	10.7	89.3	100
Cross-Validated / Homologué	1	78.5	21.5	0	100
	2	14.0	77.0	9.0	100
	3	0	10.7	89.3	100

83.6% of the original cases are correctly classified / 83,6 % des cas originaux sont classés correctement.

81.2% of the cross-validated grouped cases correctly classified / 81,2 % des cas groupés homologués de manière croisée sont classés correctement.

Table XII. Percentage classification results for multibi cocoons.**Tableau XII. Résultats du pourcentage de classification pour les cocons multibi.**

		Predicted Group membership % % d'appartenance supposée au groupe			
	Rank / Rang	1	2	3	Total
Original	1	89.8	10.2	0	100
	2	15.4	77.0	7.6	100
	3	0	30.8	69.2	100
Cross-Validated / Homologué	1	89.8	10.2	0	100
	2	15.4	77.0	7.6	100
	3	0	30.8	69.2	100

82.9% of the original cases are correctly classified / 82,9 % des cas originaux sont classés correctement.

82.9% of the cross-validated grouped cases correctly classified / 82,9 % des cas groupés homologués sont classés correctement.

The percentage of cases classified correctly is often taken as an index of the effectiveness of the discriminant function. When evaluating this measure, it is important to compare the observed misclassification rate to that expected by chance alone.

CONCLUSION

The application of Discriminant Analysis as an useful statistical technique for classification of silk cocoons based on quality, besides arriving at an unique index to represent the totality of their quality features has been established, which serves as an example of its applicability to determination of market value of any textile product.

A quality index for the cocoons based on the discriminant analysis was developed and its validity was demonstrated. Such an index would be useful in assigning a unique value to represent the quality of cocoons besides classifying the cocoons into three quality categories. This in turn would facilitate quality based price fixing during cocoon transaction.

The discriminant function was found to be efficient in classifying the cocoons into three quality groups representing the unique quality index and the cut off values for grouping them into low, medium and high quality. The expression for calculating the Cocoon Quality Index of bivoltine cocoons is: $CQI = 13.868 - 0.003(AFL) + 0.186(DC\%) - 0.618(SR\%)$, while that for multibivoltine cocoons is as follows: $CQI = 8.85 - 0.682(SR\%) + 0.414(DC\%)$.

REFERENCES

- ANON. (1996), Manual on bivoltine Silk Reeling, JICA Bivoltine Sericulture Technology Development Project, CSTRI, Central Silk Board, Bangalore.
- FRANK R.E, MASSY F.W. & MORRISON G. D. (1965), Bias in Multiple Discriminant Analysis, *Journal of Marketing Research*, II: 250-258.
- HARIRAJ (1994), Technical Report on Bivoltine Silk Production Technology, JICA and Central Silk Board, Bangalore.
- LADD & MARTIN (1976), Prices and demands for Input Characteristics, *American Journal of Agricultural Economics*, 58(1): 21-30.
- MORRISON G. Donald (1969), On Interpretation of Discriminant Analysis, *Journal of Marketing Research*, VI: 156-163.
- NAIK G. & ASOPA (1993), Evaluation of Buyer's Preference and assessment of Quality Attributes of Raw Mulberry Silk, Report submitted to the Central Silk Board, Bangalore.
- NAKAJIMA K. (1999), Report on Bivoltine Silk Reeling Technology, International Sericulture Expert Group, Indian Bivoltine Sericulture Development Project, Central Silk Board, Bangalore.
- SHIMAZAKI A. (1964), Filature Technology Lecture: Published by Sericulture association, Tokyo, 89-93.
- SOMASHEKAR T.H. (1999), Report on the visit to Sericultural Areas in China, Central Silk Board, Bangalore.
- SONWALKAR (1982), Relationship between Shell Percentage and Renditta/Raw Silk Percentage, *Indian Silk*, XXI, 14-16.
- SONWALKAR (1993), Handbook on Silk Technology, Published by Wiley Eastern Ltd., New Delhi.
- SPSS for Windows; (1999), Release 10.00, Standard Version, Copyright © SPSS Inc., USA.
- VASUMATHI B.V. (2000), An Analytical Study of the Silk Reeling Operations in Karnataka, Ph. D Thesis, Department of Management Studies, Indian Institute of Science, Bangalore.
- YAMAMOTO T. (1999), Report on Silkworm Rearing, International Sericulture Expert Group, Indian Sericulture Technology Development Project, Central Silk Board, Bangalore.

MISE AU POINT D'UN INDICE DE QUALITE DU COCON DE SOIE PAR ANALYSE DISCRIMINANTE

B. V. VASUMATHI¹, T. H. SOMASHEKAR¹, M. H. BALASUBRAHMANYA² &
K. N. KRISHNASWAMY

1. Central Silk Technological Research Institute, Bangalore, Inde.

2. Department of Management Studies, Indian Institute of Science, Bangalore, Inde.

Cet article est un rapport sur l'application de l'analyse discriminante comme moyen pour mettre au point un indice de qualité pour les cocons de soie, qui à son tour est important pour établir la valeur sur le marché. Les cocons, produits par le secteur fermier constituent l'apport pour l'industrie de la filature, qui produit la soie grège. La qualité du cocon joue un rôle décisif dans la performance de dévidage et la qualité de la soie grège. La qualité du cocon est gouvernée par plusieurs paramètres, chacun d'eux ayant un certain niveau d'importance. Il est important de les représenter comme une valeur unique ou un indice en donnant le poids approprié aux variables individuelles de qualité, que l'on a défini en tant qu'Indice de Qualité de la Soie (CQI). Le CQI est une mesure numérique ou une expression de la totalité de ces caractéristiques de qualité. La technique statistique choisie pour mettre au point le CQI est l'analyse discriminante. Les critères discriminants sont le % de richesse soyeuse et le % de cocons défectueux et on regroupe chacun d'eux en trois catégories d'après leur importance pendant le dévidage et d'après la qualité de la soie grège. La fonction discriminante s'avère efficace pour classer les cocons dans trois groupes de qualité en fonction de l'indice de qualité et pour définir les valeurs limites pour les regrouper selon leur qualité mauvaise, moyenne ou bonne. Nous avons trouvé l'expression pour calculer le CQI des cocons bivoltins et des cocons multibivoltins.

INTRODUCTION

Les cocons, la production du secteur fermier sont l'apport pour l'industrie de la filature qui produit la soie grège. La qualité du cocon contribue pour 80 % à la qualité de la soie grège et à la productivité [Shimazaki, (1964)]. De plus, les cocons en tant que matière première ont un effet significatif sur l'industrie du dévidage puisqu'ils représentent 85 à 90 % du coût de production de la soie grège [Sonwalkar, (1993)]. La qualité du cocon joue un rôle décisif dans la performance de filage et la qualité de la soie grège. La qualité des cocons a un impact significatif sur le rendement en soie grège, qui s'exprime en termes de rendement à la bassine (nombre de kg de cocons nécessaires pour dévider un kg de soie grège) et de qualité de la soie grège dévidée et en efficacité de dévidage [Hariraj, (1994)].

Bien que l'Inde soit un grand producteur de soie grège, on procède aux transactions de cocons sans les tester et leur prix se base uniquement sur une évaluation subjective de leur qualité à laquelle l'acheteur procède au moment de l'achat. Il n'existe ni un système pour l'évaluation scientifique de la qualité des cocons avant la transaction ni une approche systématique pour fixer le prix d'après leur qualité et les conditions du marché.

Cependant, dans les pays avancés sur le plan séricicole surtout au Japon et en Chine il existe une forme ou une autre d'indice de qualité qui mesure la qualité du cocon [Somashekar, (1999) et Nakajima (1999)]. Le test des cocons avant la transaction est obligatoire dans ces deux pays et on fixe le prix du cocon en fonction de sa qualité et le prix de la soie grège à l'avance pour l'année entière.

Cependant, les normes nationales disponibles dans les autres pays séricicoles ne peuvent pas être adoptées dans le contexte indien (Vasumathi, 2000). Il est donc urgent de mettre au point une méthode objective pour évaluer la qualité des cocons de manière à mettre au point un mécanisme pour organiser les transactions de cocons.

Cet article présente les détails de l'étude sur la mise au point d'un indice de qualité des cocons pour mesurer la qualité des cocons en Inde et on peut utiliser ce concept pour n'importe quel lieu spécifique et /ou matériau textile. Nous présentons d'abord les paramètres de qualité du cocon et l'indice de qualité puis l'étude et ses résultats avant de conclure.

1. Paramètres de qualité du cocon :

La qualité du cocon est gouvernée par plusieurs paramètres, chacun d'entre eux ayant un certain niveau d'importance [Anon, (1996)]. Les paramètres de qualité importants sont (1) le pourcentage de richesse soyeuse (SR %), (2) le pourcentage de cocons défectueux (% CD), (3) la longueur moyenne du filament (AFL), (4) la longueur moyenne du filament sans rupture (NBFL), (5) le titre du filament d'un cocon (SCFD) et (6) le pourcentage de dévidabilité. Parmi eux, on identifie le % SR et le % de CD comme les plus importants [Sonwalkar, (1982)]. Ils ont une répercussion plus importante sur l'efficacité de dévidage ainsi que sur la qualité du fil et ils sont relativement faciles à déterminer, et ne nécessitent que des installations, une infrastructure et un temps minimums.

Chacun des paramètres de qualité a sa propre importance relative par rapport à l'efficacité du dévidage et à la qualité de la soie grège. Les procédures pour évaluer quelques un de ces paramètres sont assez prenantes tandis que d'autres sont relativement faciles. Certains tests ne sont pas destructeurs (comme le % de CD) tandis que d'autres le sont (comme le % RS). Ainsi, chaque paramètre est associé à un certain degré de facilité ou de difficulté dans son évaluation.

2. Pertinence de l'Indice de Qualité :

La qualité est un aspect important encore plus pour les matières premières pour décider de la qualité du produit final. Quand il existe des mesures multiples de la qualité, il devient important de les représenter par une valeur unique c'est à dire par un indice intégrant le poids approprié des variables individuelles de qualité.

Ladd et Martin (1976) ont souligné l'importance de l'utilisation d'un indice unique représentant la qualité. Ils donnent l'exemple d'un chargement de maïs, dont on teste cinq caractéristiques différentes de qualité et recommandent une méthode dans un ordre spécifique pour décrire la qualité du maïs (c'est à dire pour classer les caractéristiques).

Naik G. & Asopa (1993) ont observé que lorsque des caractéristiques multiples ont un effet sur la qualité comme dans le cas de la soie grège, on définit un nombre fini (souvent petit) de classements d'après les fourchettes des valeurs de chaque caractéristique. Ils estiment que cela facilite les liaisons qualité – prix.

Nakajima (1999) a constaté que pour produire une soie grège de haute qualité, il est nécessaire de produire des cocons de bonne qualité et de dévider la soie en suivant une technique appropriée. Selon lui, il est nécessaire de réaliser le moins de tests possibles avant la transaction des cocons et de la soie grège. Pour les cocons, il a proposé la mesure du % RS et du % de CD comme base aux transactions.

Selon Yamamoto (1999) la qualité des cocons doit se refléter sur le prix du marché et il faudrait donc introduire un système pour tester les cocons comprenant deux méthodes pour mesurer la qualité du cocon et fixer le prix du cocon. Il a recommandé la mesure du pourcentage de cocons de qualité (complétant le pourcentage de cocons défectueux) et du pourcentage de richesse soyeuse.

Il est donc essentiel d'avoir une mesure semblable dans le but de comparer la qualité de deux lots ou plus ou de classer différents lots de cocons. En bref, on peut définir l'Indice de Qualité du Cocon (C.Q.I.) comme une mesure numérique ou une expression de la totalité des caractéristiques de qualité.

L'objectif de l'étude est de mettre au point un indice de qualité du cocon pour les cocons hybrides polyvoltins × bivoltins (multibi) et de faciliter leur classification en trois groupes de qualité distincts, qui à leur tour permettront d'estimer la valeur sur le marché pendant la transaction.

METHODOLOGIE

La méthode est constituée des étapes suivantes :

- (1) On retient un ensemble de paramètres définissant la qualité du cocon.
- (2) On extrait les paramètres les plus importants influençant le rendement à la bassine, qui est une mesure de la qualité du cocon.
- (3) On procède à l'analyse discriminante en utilisant les paramètres extraits, en classant les données dans trois groupes selon leur qualité mauvaise, moyenne ou bonne.
- (4) On réalise les analyses séparément pour les cocons bivoltins et multibi.
- (5) On détermine la fonction discriminante pour représenter l'indice de qualité avec les paramètres de qualité du cocon comme variables indépendantes.
- (6) Validation des résultats de l'analyse discriminante.

1. Données et échantillons :

Cocons bivoltins :

La production de cocons bivoltins est relativement nouvelle en Inde par comparaison aux cocons multibi. Cependant, en raison de sa qualité supérieure, on accorde plus d'importance à la production de soie bivoltine qui, à l'heure actuelle, représente moins de 5 % de la production totale de cocons. Les données pour les cocons bivoltins de la race CSR obtenus auprès des fermiers et testés au *Central Silk Technological Research Institute* (CSRTI) pendant une période de quatre ans sont recueillies pour l'analyse. Les données pour environ 600 lots de cocons ainsi testés constituent l'apport pour l'analyse discriminante. Les variables incluent le % RS, le % CD, l'AFL, le NBFL, le SCFD et la dévidabilité. On fait rentrer les paramètres de qualité du cocon de l'analyse discriminante les plus significatifs dans l'expression du CQI.

Cocons multibivoltins :

On recueille les données de terrain sur la qualité des cocons provenant de cinq marchés aux cocons de catégorie I dans l'état du Karnataka en Inde (c'est à dire Ramanagaram, Siddlaghatta, Vijayapura, Kolar et Kollegal) pendant une période de deux ans de juillet 1996 à juin 1998. Il y a un minimum de 100 lots de cocons par jour représentant les transactions de cocons de l'Etat. Ici les données ne comprennent que le % RS et le % CD.

2. Analyse des données :

On procède à une analyse de régression linéaire avec tous les paramètres de qualité du cocon comme variables indépendantes et le rendement à la bassine comme variable dépendante pour s'assurer de l'importance du % RS et du % de CD pour expliquer la variabilité de la performance de dévidage mesurée en termes de rendement à la bassine. Les données disponibles au CSRTI sont utilisées dans ce but. Le % RS, le % CD et l'AFL sont les trois variables que l'on fait entrer dans l'équation, expliquant la variabilité du rendement à la bassine.

On utilise l'analyse discriminante pour classer les lots de cocons d'après un ensemble de variables indépendantes en trois groupes mutuellement exclusifs et exhaustifs [Morrison (1969)]. Avec l'analyse discriminante, on forme une combinaison linéaire des variables indépendantes et elle sert de base pour classer les cas dans les groupes. Ainsi, on résume l'information contenue sur les variables indépendantes en un indice unique qui répond à l'objectif du CQI.

On détermine les **critères discriminants** comme le % RS et le % CD et on regroupe chacun d'eux en trois catégories (mauvaise, moyenne et bonne qualité) d'après leur importance pendant le dévidage

et d'après la qualité de la soie grège. Dans ce but, on prend en considération les paramètres du cocon entraînant une très bonne performance, une performance moyenne et une performance en-dessous de la moyenne pendant le dévidage, d'après les experts.

On donne un classement respectivement de 3, 2 et 1 en fonction de la qualité mauvaise, moyenne et bonne pour chacun des paramètres. On calcule la somme des classements pour le % RS et le % CD. Une somme des classements de 5 et 6 est prise comme un classement 3 (ou mauvaise qualité), une somme des classements de 4 est prise comme classement 2 (ou qualité moyenne) et une somme de classements de 2 et 3 est prise comme classement 1 (ou qualité élevée).

L'analyse canonique discriminante est effectuée en suivant une méthode par étapes avec la distance de Mahalanobis et les critères choisis sont ceux dont la valeur F est de 3,84 pour l'entrée et de 2,71 pour le retrait au seuil de 5 % de signification. Les probabilités utilisées sont celles de Fisher et ne sont pas standardisées. On compare les moyennes des groupes en utilisant la distance de Mahalanobis.

On utilise la méthode de Frank et coll., (1965) pour valider les résultats de l'analyse discriminante. On divise les données existantes en deux sous-ensembles dans un rapport de 75 / 25 pour essais et tests afin de procéder à la validation. On sélectionne 25 % des cas au hasard. On utilise le sous-ensemble d'essais comprenant 75 % des données pour procéder à la fonction discriminante ; pour valider le modèle ainsi obtenu, on utilise le sous-ensemble test comprenant 25 % des données [SPSS, (1999a)].

Les suppositions concernant les données pour une analyse discriminante valide sont que (1) les variables suivent une distribution normale multivariée et que (2) la variance de groupe et les matrices de covariance soient égales.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Fonctions discriminantes :

Les valeurs propres pour la fonction discriminante sont présentées dans les Tableaux I & II.

Dans les deux cas, la première fonction discriminante agit très efficacement pour séparer les trois groupes. Tandis que les deux fonctions font des distinctions considérables entre les groupes, la première fonction est plus significative parce qu'elle représente la plus grande part de la variance discriminante. La corrélation pour une fonction est la racine carrée du rapport entre les groupes par rapport aux sommes totales des carrés. Quand on les élève au carré, cela représente la proportion de la variabilité totale expliquée par les différences entre les groupes. Elle mesure l'association entre les résultats discriminants et les groupes.

On teste l'égalité des fonctions discriminantes en utilisant le Lambda de Wilk (part de la variance totale dans les résultats discriminants non expliquée par des différences entre les groupes). On utilise Lambda pour tester l'hypothèse nulle que les moyennes de toutes les variables pour tous les groupes sont égales et il fournit peu d'information sur le succès du modèle pour classer les cas. Pour tester sa taille, on transforme Lambda en une variable avec une distribution Chi-carré approximative. Le niveau de signification du Lambda de Wilk observé ici s'appuie sur la transformation du chi-carré des statistiques. La valeur de Lambda et sa valeur Chi-carré associée, les degrés de liberté et le niveau de signification sont présentés dans les Tableaux III et IV. On peut noter que le chi carré indique une différence très significative entre les barycentres des groupes. Ainsi, l'hypothèse nulle que les moyennes des deux fonctions sont égales dans les trois populations peut être rejetée dans les deux cas.

2. Contribution du % RS et du % de CD aux fonctions discriminantes :

Coefficient standardisé :

Les coefficients standardisés évaluent la contribution de chaque variable par rapport à la fonction discriminante. Les contributions des variables pour le % RS et pour le % CD ne sont pas très

différentes, tandis que pour les cocons bivoltins l'AFL a une contribution relativement plus faible. Le % RS et le % CD reflètent en grande partie la qualité et il est raisonnable de n'utiliser que ces deux paramètres pour les cocons multibi (Tableau V & VI).

Matrice de la structure :

La matrice de la structure (un ensemble de corrélations à l'intérieur des groupes de chaque variable prédictive avec la variable canonique) représente une autre manière d'étudier l'utilité de chaque variable dans la fonction discriminante. Quand il y a plus de deux groupes (et plus de deux variables), on imprime les corrélations à l'intérieur du groupe pour chaque variable canonique, et on regroupe les variables avec des corrélations importantes pour une variable canonique particulière et on les marque avec un astérisque (Tableaux VII et VIII).

Fonction discriminante pour l'Indice de Qualité du Cocon :

Bien que tous les paramètres de qualité soient inclus dans l'analyse pour mettre au point le CQI des cocons bivoltins, le modèle n'inclut cependant que trois paramètres c'est à dire, le % RS, le % CD et l'AFL comme variables ayant une répercussion importante pour classer les cocons en fonction de leur qualité faible, moyenne et élevée. Les Tableaux IX et X présentent les coefficients des variables et la constante de la fonction discriminante permettant d'obtenir le CQI pour les cocons bivoltins et multibi respectivement. Les signes des coefficients sont arbitraires et la séparation entre les groupes serait la même si chaque coefficient était multiplié par (-1) .

Moyennes des barycentres du groupe :

On calcule les moyennes à l'intérieur du groupe pour chaque variable canonique. Dans le cas des cocons bivoltins, le résultat de la variable canonique ou le résultat discriminant moyen pour le groupe 1 est $-2,103$, pour le groupe 2, $-0,348$ et pour le groupe 3 : $2,421$. Pour les cocons multibi, le résultat de la variable canonique ou le résultat discriminant moyen pour le groupe 1 est $-1,152$, pour le groupe 2 c'est $0,934$ et pour le groupe 3, $2,380$. Ces résultats représentent les valeurs moyennes pour les trois catégories de cocons respectivement élevée, moyenne et mauvaise. On obtient les valeurs limites pour les trois catégories en fonction du point médian de deux moyennes de barycentres consécutives.

Classification en pourcentage :

On calcule l'appartenance au groupe en fonction du cas et on compare l'appartenance réelle au groupe à l'appartenance prévue par l'analyse discriminante. On utilise les estimations du coefficient de la fonction de classification pour calculer un résultat pour chaque groupe puis les classer dans un groupe particulier. Les probabilités postérieures indiquent la probabilité de chaque cas de devenir un membre de chaque groupe. Une façon de calculer ces probabilités pour chaque cas est de calculer d'abord la distance de Mahalanobis (D^2) du cas par rapport à chaque moyenne du groupe et de calculer le ratio de $\exp(-D^2)$ pour le groupe par rapport à la somme de $\exp(-D^2)$ pour tous les groupes (Tableaux XI & XII).

On prend souvent le pourcentage des cas classés correctement comme un indice de l'efficacité de la fonction discriminante. Quand on évalue cette mesure, il est important de comparer le taux de mauvais classements observés par rapport à celui qui peut être attendu du hasard seul.

CONCLUSION

On a utilisé l'analyse discriminante comme technique statistique utile pour classer les cocons en fonction de leur qualité, tout en arrivant à un indice unique représentant la totalité de leurs caractéristiques de qualité ; cela montre qu'on peut l'utiliser pour déterminer la valeur marchande de n'importe quel produit textile.

Nous avons mis au point un indice de qualité des cocons d'après l'analyse discriminante et nous avons prouvé sa validité. Un tel indice serait utile pour attribuer une valeur unique représentant la qualité des cocons et pour classer les cocons en trois catégories de qualité. A son tour il faciliterait la fixation d'un prix basé sur la qualité au cours des transactions de cocons.

La fonction discriminante est efficace pour classer les cocons en trois catégories de qualité qui représentent un indice de qualité unique et pour déterminer les valeurs limites pour les regrouper en fonction de leur qualité mauvaise, moyenne et élevée. L'expression pour calculer l'Indice de Qualité des cocons bivoltins est : $CQI = 13,868 - 0,003 (AFL) + 0,186 (\% CD) - 0,618 (\% RS)$ tandis que celui pour les cocons multibi est le suivant : $CQI = 8,85 - 0,682 (\% RS) + 0,414 (\% CD)$.

ETUDE COMPARATIVE DE L'EXPRESSION DU SEXE CHEZ LE MURIER, *MORUS ALBA* L. - DÉVELOPPEMENT FLORAL

T. C. FONSECA¹, J. E. ALMEIDA², G. BANDEL³, M. C. DORNELAS⁴

1. Instituto de Zootecnia, APTA, Rua Heitor Penteado, 56 CEP 13.460-000 Nova Odessa, SP, Brasil. Email : tfonseca@iz.sp.gov.br

2-UPDGalicia, APTA Regional, CP CEP 17 , Gália, SP Email : updgalicia@aptaregional.sp.gov.br

3-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP-Departamento de Genética, Avenida Pádua Dias, 11, CP 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. Email: gbandel@esalq.usp.br

4- Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP - Av. Centenário, 303 - CEP 13400-961, Piracicaba, São Paulo Email : mcdornel@cena.usp.br

Nous avons effectué une étude comparative du développement des organes floraux chez 3 clones du mûrier, Catânia Paulista, Formosa et le F1, IZ56/4 à partir d'observations morphologiques par microscopie électronique à balayage et microscopie optique et des hybridations in situ en utilisant comme sondes des gènes hétérologues d'Arabidopsis AP1, AP3 et AG (modèle ABC).

Mots clés : Mûrier; modèle ABC; MADS.

INTRODUCTION

Les études de la structure florale ont commencé à partir de l'observation des formes florales et des diagrammes floraux de mutants trouvés dans la nature. Deux plantes ont été choisies comme modèles pour ces études: *Arabidopsis thaliana* et *Antirrhinum majus* en raison de leurs nombreux mutants disponibles et de leur facilité de culture (Coen and Meyerowitz, 1991; Meyerowitz et coll., 1991).

A partir de ces études, on a défini l'existence de 3 facteurs dont l'action isolée ou combinée est responsable de l'identité et de la position des organes floraux. Ces facteurs appartiennent à 3 groupes de gènes homéotiques, dont la majorité appartient à la famille MADS (groupes A, B et C) des facteurs de transcription. Ce modèle a été appelé modèle ABC (Coen and Meyerowitz 1991).

Dans le groupe des plantes à fleur, les angiospermes possèdent, dans leur majorité, des fleurs composées de 4 verticilles (cercles d'organes) : deux extérieurs ne contenant que des organes stériles, sépales dans le 1^{er} et pétales dans le 2^{ème} ; et deux verticilles intérieurs, contenant les organes fertiles, les étamines dans le 3^{ème} et les carpelles dans le 4^{ème}.

Chaque groupe du modèle s'exprime dans deux verticilles adjacents. Ainsi, l'expression des gènes du groupe A s'exprime dans les verticilles un et deux, du groupe B dans les verticilles deux et trois, et du groupe C dans les verticilles trois et quatre.

L'expression isolée des gènes du groupe A assure la formation des sépales; l'expression combinée des gènes des groupes A et B assure la formation des pétales; l'expression combinée des gènes des groupes B et C assure la formation des étamines et l'expression isolée des gènes du groupe C assure la formation du carpelle. Le modèle prévoit aussi que les activités des gènes des groupes A et C s'excluent mutuellement et que les gènes du groupe C déterminent le méristème floral.

Les outils de la biotechnologie ont rendu possible de tester, sur la base moléculaire, le modèle ABC, fondé principalement sur des évidences morphologiques. Ces gènes ont été identifiés, clonés

et séquencés: gènes du groupe A, *APETALA1* (*API*) et *APETALA2* (*AP2*) (Komaki et coll., 1988), gènes du groupe B, *APETALA3* (*AP3*) et *PISTILLATA* (*PI*) (Krizek et Meyerowitz, 1996) et du groupe C, *AGAMOUS* (*AG*) (Yanofsky et coll., 1990; Theissen et coll., 2000).

Le modèle ABC a été testé pour plusieurs plantes, des angiospermes aux gymnospermes (Theissen et coll., 2000) en expliquant presque complètement tous les aspects de la formation du modèle du développement floral chez les plantes et la conservation de ce modèle pendant l'évolution.

L'obtention d'un clone mutant pendant l'élaboration d'un programme d'amélioration du mûrier, *Morus alba* L. (Fonseca et coll., 1993), a éveillé un grand intérêt dans son étude.

Elaboré aux environs de 1965, le projet avait pour but l'augmentation de la productivité de la sériciculture brésilienne avec des croisements entre des variétés importées et des variétés natives (Fonseca et coll., 1993) lesquelles possèdent, dans leur totalité, des fleurs unisexués, ce qui les caractérisent comme des plantes dioïques.

Dans le cadre de ce projet on a obtenu des clones chez lesquels on a observé deux nouvelles caractéristiques : la présence de caractères monoïques, c'est à dire, des fleurs mâles, femelles et hermaphrodites sur une même plante, et l'influence de l'environnement sur l'expression sexuelle de ces clones.

D'après les résultats de Coen et Meyerowitz (1991) qui ont essayé d'expliquer, du point de vue génétique, ces nouveaux modèles floraux chez le mûrier, nous avons commencé une étude comparative entre deux variétés, une qui ne produit que des fleurs mâles, la variété Catânia Paulista et l'autre qui ne produit que des fleurs exclusivement femelles, la variété Formosa, et un clone venu du croisement entre ces deux variétés (IZ56/4) qui porte des fleurs mâles, femelles et hermaphrodites. Pour cette étude il a été nécessaire non seulement de caractériser morphologiquement ces clones, mais aussi d'étudier leur développement floral et l'expression des gènes qui sont probablement impliqués dans le processus.

MATERIELS ET METHODES

On a réalisé des études comparatives entre des variétés de mûrier présentant des caractéristiques dioïques (Formosa qui présente des fleurs diclines femelles et Catânia Paulista qui présente des fleurs diclines mâles) et le clone IZ56/4 qui provient de ce croisement et qui présente des fleurs diclines mâles et femelles et monoïques, qui sont les caractéristiques d'une plante monoïque.

Dans cette première étape de travail, on a procédé aux observations morphologiques par microscopie électronique à balayage et microscopie optique. Pour cela, on a choisi des inflorescences à différentes étapes du développement et on les a fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 24 heures, sous vide, déshydratées dans une série de concentrations croissantes d'éthanol jusqu'à 100% et conservées au réfrigérateur à 4°C.

Préparation de l'inflorescence pour l'analyse au microscope :

1) à balayage :

On dissèque les inflorescences dans de l'éthanol à 100% sous loupe binoculaire Olympus, on les soumet au séchage au point critique avec du CO₂, on les monte sur un porte objets en aluminium, on les recouvre d'or colloïdal et on les observe par microscopie électronique à balayage sous DSM940 LEO du NAP/MEPA de l'ESALQ/USP.

2) optique :

On inclut les inflorescences dans une résine plastique, l'hystoresine (Leica); pour cela on les traite dans une série d'hystoresine de 30% à 100%, on polymérise à température ambiante (25 °C) pendant 48 heures et on les fixe à une base en bois pour réaliser des coupes avec microtome. Les coupes de 5µm sont collées sur des lames de verre et on séchées à 50° C. Après le séchage on colore les coupes

avec du bleu de toluidine (Dornelas et coll., 1992) pour l'observation ultérieure au microscope Zeiss Axiovert 35 du Laboratório de Biotecnologia Vegetal, CENA/USP.

Hybridation *in situ* –

On place des inflorescences, aux étapes de développement appropriées pour l'hybridation *in situ*, dans du paraformaldéhyde 4%, 24 heures sous vide, on les déshydrate dans une série d'éthanol jusqu'à 100% et on les place au congélateur (– 20 °C).

On réalise l'hybridation *in situ* d'après la description de Dornelas et coll. (1999) et Schimidt et coll. (1996) à l'exception des lavages comme suit: deux lavages en 4 × SSC à 37 °C pendant 20 minutes chacun, suivi de deux lavages en 2 × SSC dans les mêmes conditions.

On prépare des sondes des gènes *APETALA 1* (*AP1*), *APETALA 3* (*AP3*) et *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis thaliana* (tableau ci-dessous) et on effectue un marquage digoxigénique (DIG-UTP) en utilisant le Kit T7/SP6 (Roche, Allemagne).

Gene	Origine	Plasmide
AP1	Dr. Martin Yanofsky, University of the California, La Jolla, USA	pKy89
AP3	Dr. Tom Jack, Dartmouth College, New Hampshire, USA	pD1136
AG	Dr. Martin Yanofsky, University of the California, La Jolla, USA	PCIT565

RESULTATS ET DISCUSSION

Pour réaliser l'étude de l'ontogénie florale chez le mûrier, nous avons caractérisé le développement en neuf étapes (Tableau I).

Tableau I. Caractérisation du développement floral du mûrier en neuf étapes.

Table I. Characterization of mulberry floral development in nine stages.

Etape 0 <i>Stage 0</i>	Les méristèmes latéraux sont végétatifs <i>Lateral meristems are vegetative</i>
Etape 1 <i>Stage 1</i>	Différenciation du méristème de l'inflorescence <i>Differentiation of the meristem of the inflorescence</i>
Etape 2 <i>Stage 2</i>	Début de la différenciation du méristème floral <i>Beginning of the differentiation in the floral meristem</i>
Etape 3 <i>Stage 3</i>	Début de la différenciation du premier tépale (abaxial) <i>Beginning of the differentiation of the first tepal (abaxial)</i>
Etape 4 <i>Stage 4</i>	Début de la différenciation des trois autres tépales. <i>Beginning in the differentiation of the other three tepals</i>
Etape 5 <i>Stage 5</i>	Début de la différenciation des étamines (cette étape est absente chez les variétés exclusivement femelles) <i>Beginning of the stamens differentiation (this stage is absent in exclusively female varieties)</i>
Etape 6 <i>Stage 6</i>	Début de la différenciation du primordium du carpelle <i>Beginning of the differentiation of the primordium of the carpel</i>
Etape 7 <i>Stage 7</i>	Commencement de la différenciation du primordium de l'ovule <i>Beginning of the differentiation of the primordium of the ovule</i>
Etape 8 / Stage 8 Fleur dans l'anthesis / <i>Flower in anthesis</i>	

Figure 1 - Changements morphologiques des méristèmes chez le mûrier observés sous microscopie électronique à balayage.

A : Méristème apical végétatif chez Formosa (stade 0). Observez le méristème protégé par les primordia des feuilles. **B :** Méristème apical végétatif chez Catânia Paulista (stade 0). On a retiré quelques primordia de feuilles pour une meilleure observation des méristèmes. **C :** Méristème de l'inflorescence avec des méristèmes floraux (flèche-mf) chez la variété Formosa, protégés par des bractées (flèche-br). **D :** Inflorescence du clone IZ 56/4 avec des méristèmes floraux à différentes étapes du développement 0 à 6, selon le Tableau I. **E :** Inflorescence du clone Formosa chargée de fleurs dioïques femelles. Les fleurs sont placées sur l'axe de l'inflorescence de façon à caractériser un côté ventral (inflorescence à droite) et un côté dorsal (inflorescence à gauche). **F :** Groupe d'inflorescences du clone mâle Catânia Paulista. Chaque inflorescence est protégée par une bractée.

Légendes: **br** = bractée ; **ca** = carpelle ; **cd** = côté dorsal ; **ff** = fleur femelle ; **fh** = fleur hermaphrodite ; **fm** = fleur mâle ; **cv** = côté ventral ; **mf** = méristème floral ; **pf** = primordium de feuille ; **tb** = tépale abaxial ; **td** = tépale adaxial ; **tl** = tépale latéral. Barres: **A:** 266 µm ; **B:** 143 µm ; **C:** 189 µm ; **D:** 60 µm ; **E:** 735 µm ; **F:** 1,33mm.

Figure 1 - Morphological changes of meristems in mulberry observed under scanning electronic microscopy.

A: Apical vegetative meristem in Formosa (stage 0). The meristem is protected by the primordium of the leaves. **B:** Apical vegetative meristem in Catânia Paulista (stage 0). Some primordium of the leaves were removed for a better observation of the meristems. **C:** Meristem of the inflorescence with some floral meristems (arrow - mf) in the Formosa variety, protected by bracts (arrow-br). **D:** Inflorescence of the IZ 56/4 clone with floral meristems at different stages of their development 0 to 6, according to Table I. **E:** Inflorescence of the Formosa clone with dioecious female flowers. Flowers are placed on the axis of the inflorescence so that they can characterize a ventral side (inflorescence on the right side) and a dorsal side (inflorescence on the left side). **F:** Group of inflorescences of the male clone Catânia Paulista. Each inflorescence is protected by one bract.

Legends: **br** = bract, **ca** = carpel; **cd**: dorsal side; **ff** = female flower; **fh** = hermaphrodite flower; **fm** = male flower; **cv** = ventral side; **mf** = floral meristem; **pf** = leaf primordium; **tb** = abaxial tepal; **td** = adaxial tepal; **tl** = lateral tepal. Bars: **A:** 266 µm ; **B:** 143 µm ; **C:** 189 µm, **D:** 60 µm ; **E:** 735 µm ; **F:** 1.33 mm.

Caractérisation des méristèmes et formation de l'inflorescence :

L'étape 0 (zéro) représente le méristème végétatif qui produit des feuilles et est protégé par elles (Figures 1A,B, 3A et 4A). Le passage au méristème de l'inflorescence (Figures 1C et 4A) quand le méristème végétatif cesse de produire des feuilles et commence la production des méristèmes de l'inflorescence qui se forment à la base de la feuille et sont protégés par des bractées pendant tout le développement floral (Figures 1C et 1F) caractérise l'étape 1.

Des petits groupes de cellules en division sont localisés selon un modèle standardisé sur le méristème de l'inflorescence en formant les méristèmes floraux (Figures 1C) au début de l'étape 2. Le modèle d'emplacement, acropétalaire, des méristèmes floraux par rapport à l'axe du méristème de l'inflorescence permet de distinguer 2 cotés différents dans l'inflorescence, le côté ventral ou adaxial (Figure 1E - à droite) et le côté dorsal ou abaxial (Figure 1E - à gauche). La formation d'un primordium floral dans la portion terminale de l'inflorescence caractérise le méristème.

Développement de la fleur :

Les primordiums floraux se développent d'une façon semblable chez les trois variétés étudiées, qu'elles soient productrices de fleurs exclusivement femelles (Formosa - dioïque) ou de fleurs exclusivement mâles (Catânia Paulista - dioïque), aussi bien que chez la fleur hermaphrodite du clone hybride IZ56/4 (cultivar monoïque). Des caractéristiques florales appartenant aux deux progéniteurs sont présentes en F1 où se forment des fleurs hermaphrodites comme celles observées chez le clone IZ56/4 lequel différencie ses primordium floraux aux mêmes étapes.

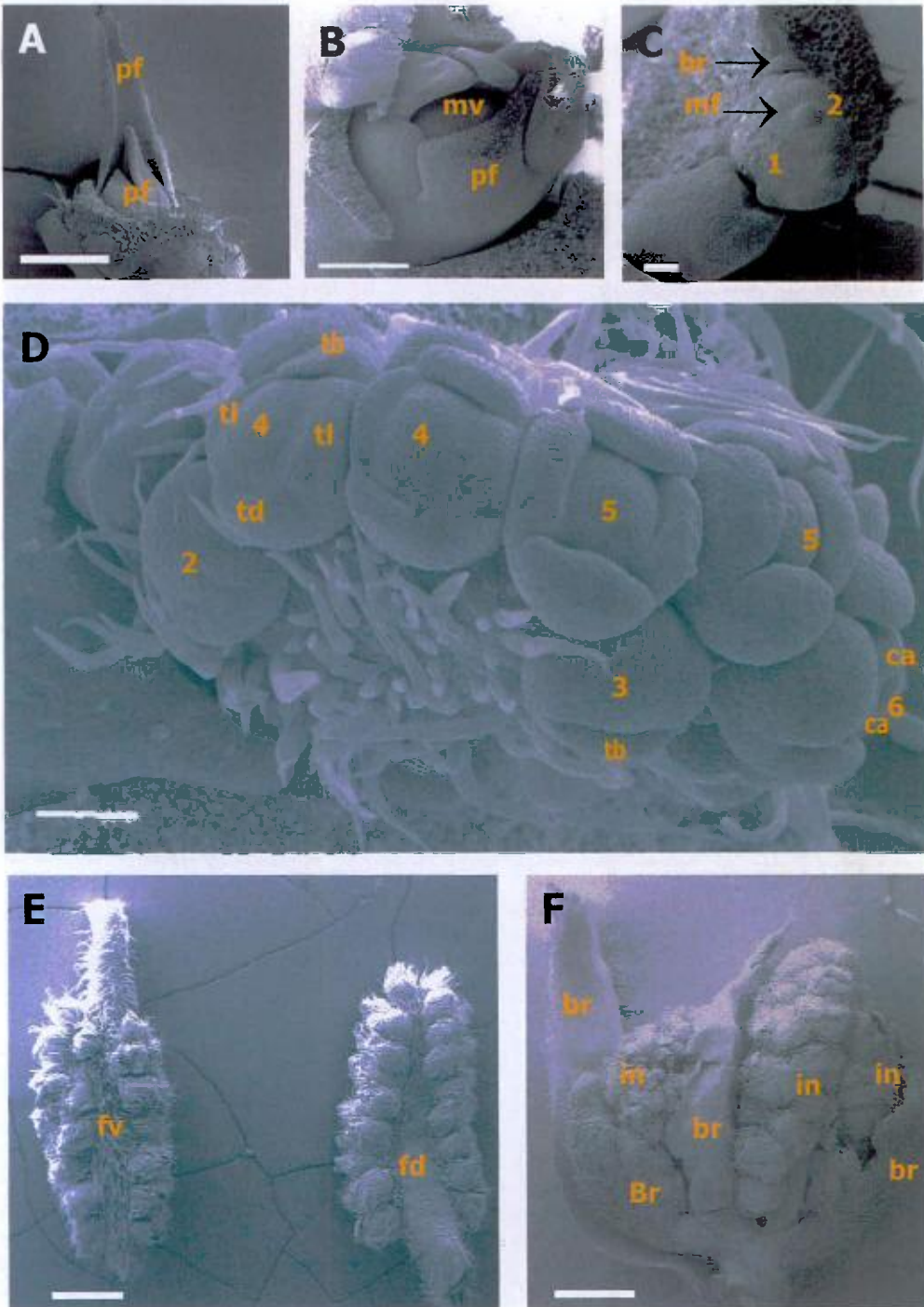


Figure 2 - Développement de la fleur femelle chez la variété Formosa observée sous microscopie électronique à balayage (A à E, G à I) et microscopie optique (F).

A : Méristème floral au début de la formation des primordia de tépales, pendant le passage de l'étape 2 à l'étape 3 ; B : Méristème floral pendant l'étape 4, en différenciation des quatre primordia des tépales ; C : Méristème floral après la différenciation des primordia des quatre tépales, pendant le passage à l'étape 6 ; D : Méristème floral au début de l'étape 6. Noter l'invagination dans le centre du méristème pour la formation des primordia des carpelles ; E : Méristème floral pendant l'étape 7. Noter le développement différentiel des deux primordia du carpelle ; F : Coupe longitudinale d'une fleur à l'étape 7. On observe la fusion des carpelles au début de la formation du style. Noter aussi la formation du sac embryonnaire (flèche) ; G : Coupe longitudinale d'une fleur pendant le passage à l'étape 8. On observe le début d'une courbure caractéristique des stigmates et la placentation pariétale de l'ovule ; H : Vue détaillée des stigmates courbés d'une fleur pendant l'anthèse (étape 8) ; I : Fleur femelle pendant l'anthèse. Noter que l'ovaire est complètement couvert par les tépales recouverts par un nombre important de trichomes.

Légende: ca: carpelle ; st: style ; sg: stigmate ; mf: méristème floral ; ov: ovaire ; tb: tépale abaxial ; td: tépale adaxial ; tl: tépale latéral. Barres: A-C: 60µm; D: 80µm; E: 50µm; F: 25µm; G: 175µm; H-I: 300µm.

Figure 2 - Development of the female flower in the Formosa variety observed under scanning electronic microscopy (A to E, G to I) and optical microscopy (F).

A: Floral meristem at the beginning of the formation of the primordium of the tepals during the transition from stage 2 to stage 3; B: Floral meristem during stage 4, being differentiated from the four primordium of the tepals; C: Floral meristem after the differentiation of the primordium of the four tepals during the transition to stage 6; D: Floral meristem at the beginning of stage 6. Please note the invagination in the centre of the meristem for the formation of the primordium of the carpels. E: Floral meristem during stage 7. Please note the differential development of the two primordium of the carpels; F: Longitudinal section of a flower at stage 7. The fusion of the carpels at the beginning of the formation of the style can be observed. Please also note the formation of the embryonic sac (arrow). G: Longitudinal section of a flower during the transition to stage 8. The beginning of a characteristic curve of the stigmates and the parietal placentation of the ovule can be observed; H: Detailed view of the curved stigmates of a flower during anthesis (stage 8); I: Female flower during anthesis. Please note that the ovary is completely covered by tepals recovered by an important number of trichomes.

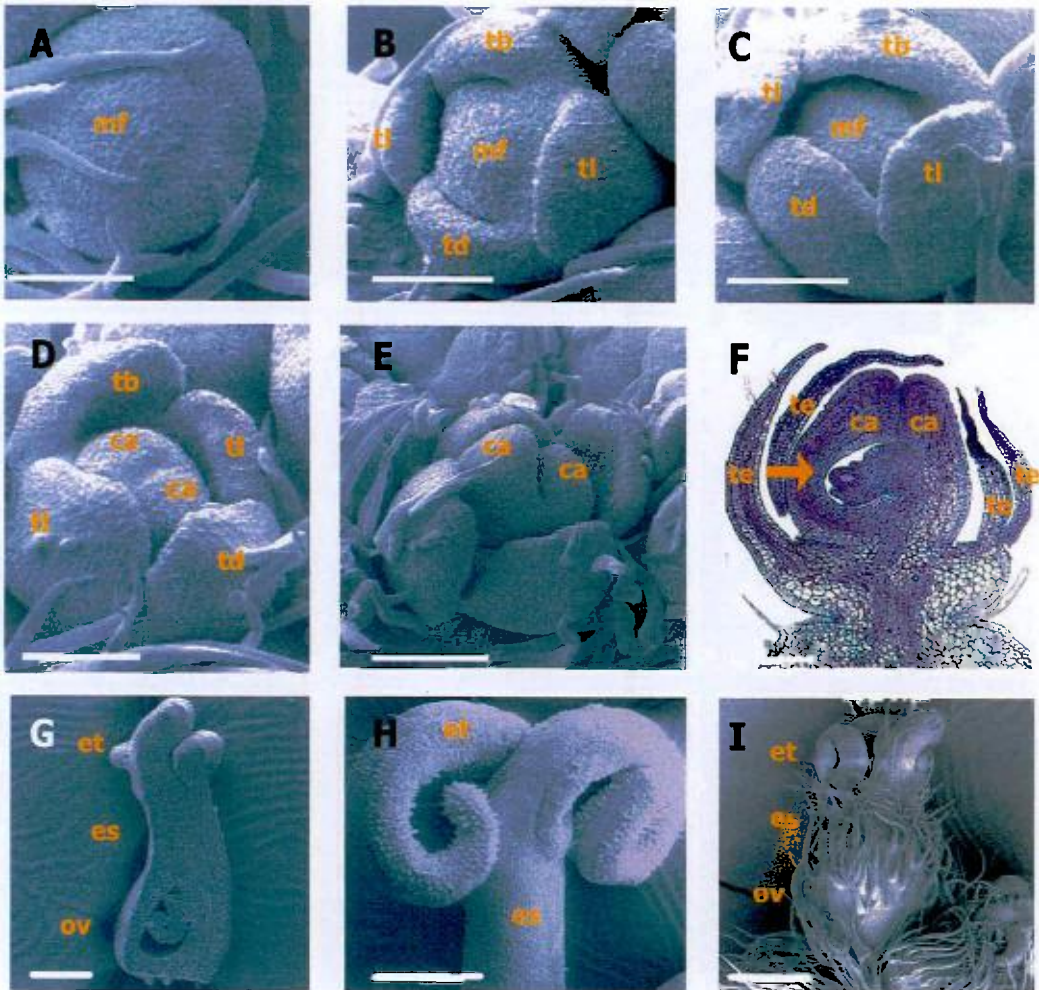
Legend: ca: carpel; st: style; sg: stigma; mf: floral meristem; ov: ovary; tb: abaxial tepal; td: adaxial tepal; tl: lateral tepal; Bars: A-C: 60µm; D: 80 µm; E: 50 µm; F: 25 µm; G: 175 µm; H-I: 300 µm.

On observe les premiers signes du début de la différenciation des organes floraux par la présence de divisions cellulaires dans les couches L1 et L2 pour former le premier organe floral le tépale abaxial (Figures 1D, 2A et 4B) au début de l'étape 3 du développement, puis la formation des tépales adaxiaux et latéraux (Figures 1D, 2B et 4B) lors de l'achèvement de l'étape 4.

La différenciation des primordium des organes fertiles, étamines et carpels, signale respectivement le début des étapes 5 et 6. A la base interne des primordia des tépales, des divisions cellulaires, dans les couches L1 et L2, indiquent la formation des primordia des étamines. Chez la fleur exclusivement femelle, la différenciation des primordia des étamines est interrompue, les organes mâles n'achèvent pas leur développement.

Cette interruption de leur développement n'est pas standardisée, elle peut arriver à des moments différents et c'est ce qui donne l'origine aux fleurs qui ne possèdent aucune trace d'étamine avec des primordium de dimensions différentes mais qui n'achèvent pas leur développement (Figure 2F). Chez les fleurs mâles ou hermaphrodites, le développement des étamines se déroule normalement, en atteignant la différenciation complète avec la formation de 4 étamines (Figures 3B et 3C) qui produisent une grande quantité de pollen (Figure 3D). On observe le modèle constant de 4 anthères chez les fleurs exclusivement mâles de la variété Catânia Paulista et chez les fleurs hermaphrodites du clone IZ56/4 qui présente de 1 à 4 étamines. L'autre caractéristique intéressante du clone hybride c'est la formation de deux formes d'anthères, le type rond (Figure 4D) que l'on trouve aussi chez la descendance masculine et le type coeuriforme (Figure 4E et 4F) seulement observé chez l'hybride.

Le développement différentiel des deux primordium des carpelles (Figures 2D et 2E), indique le début de l'étape 7. Ces carpelles subissent une fusion post-génitale pour former l'ovaire (Figure 2F) où sera formé le primordium de l'ovule (Figure 2F) sur le côté interne du carpelle le plus court



(Figure 2G). La fusion des carpelles continue jusqu'à former un style dont la longueur dépend de l'espèce, et cette variation a été utilisée par Koidzume (Rangaswami et coll., 1976) pour diviser le genre *Morus* en 2 groupes: les Dolichostylae (style court ou absent) et les Macromorus (style long). L'espèce *Morus alba* appartiendrait au deuxième groupe. La fleur femelle est formée par quatre tépales qui protègent totalement l'ovaire mais qui expose le style et les stigmates (Figure 2I).

Figure 3 - Développement de la fleur mâle chez la variété Catânia Paulista observée en microscopie électronique à balayage (A, C, D, F et I) et microscopie optique (B et E). Toutes les figures représentent les fleurs pendant les étapes 7 et 8, sauf la figure A où le méristème se trouve à l'étape 1.

A : Méristème de l'inflorescence protégé par deux bractées. **B :** Coupe transversale d'une fleur. Noter la formation des quatre anthères composées chacune de deux sacs polliniques. **C :** Une fleur sans les tépales montrant ses quatre anthères. Noter le gynécée aberrant au centre de la fleur. **D :** Coupe longitudinale d'une theca, où on peut voir des cellules du tapetum, rempli des grains de pollen. **E :** Coupe longitudinale d'une fleur. On note la forme ronde des anthères caractéristique du type sauvage (variété parentale mâle). **F :** Fleur mâle à laquelle on a retiré deux anthères pour permettre de voir le gynécée en dégénérescence. **G :** Cellules turgescentes du carpelle en développement. **H :** Cellules du carpelle en dégénérescence. **I :** La fleur avant l'anthèse. Noter que les tépales recouvrent totalement les anthères. Au centre on peut observer le gynécée en dégénérescence.
Légende: **an:** anthère; **br:** bractée; **gy:** gynécée; **mi:** méristème de l'inflorescence; **te:** tepale. Barres: **A:** 70µm; **B:** 780µm; **C:** 780µm; **D:** 160µm; **E:** 320µm; **F:** 320µm; **G:** 11µm; **H:** 100µm; **I:** 500µm.

Figure 3 - Development of the male flower in the Catania Paulista variety observed under scanning electronic microscopy (A, C, D, F and I) and optical microscopy (B and E). All the figures represent the flowers during stages 7 and 8, except figure A, where the meristem is at stage 1.

A: Meristem of the inflorescence protected by two bracts. **B:** Cross section of a flower. Please note the formation of four anthers each made up of two pollen sacs. **C:** A flower without tepals showing its four anthers. Please note the aberrant gynecium at the centre of the flower. **D:** Longitudinal section of a theca, where cells from the tapetum, filled with pollen grains can be seen. **E:** Longitudinal section of a flower. The round form of the anthers characteristic of the wild type can be noted (male parental variety). **F:** Male flower to which two anthers were removed in order to see the degenerescent gynecium. **G:** Turgid cells of the developing carpel. **H:** Cells of the degenerescent carpel. **I:** The flower before the anthesis. Please note that the tepals totally recover the anthers. The degenerescent gynecium can be observed at the centre.
Legend: **an:** anther, **br:** bract; **gy:** gynecium; **mi:** meristem of the inflorescence; **te:** tepal. Bars: **A:** 70 µm; **B:** 780 µm; **C:** 780 µm; **D:** 160 µm; **E:** 320 µm, **F:** 320 µm, **G:** 11 µm; **H:** 100 µm; **I:** 500 µm.

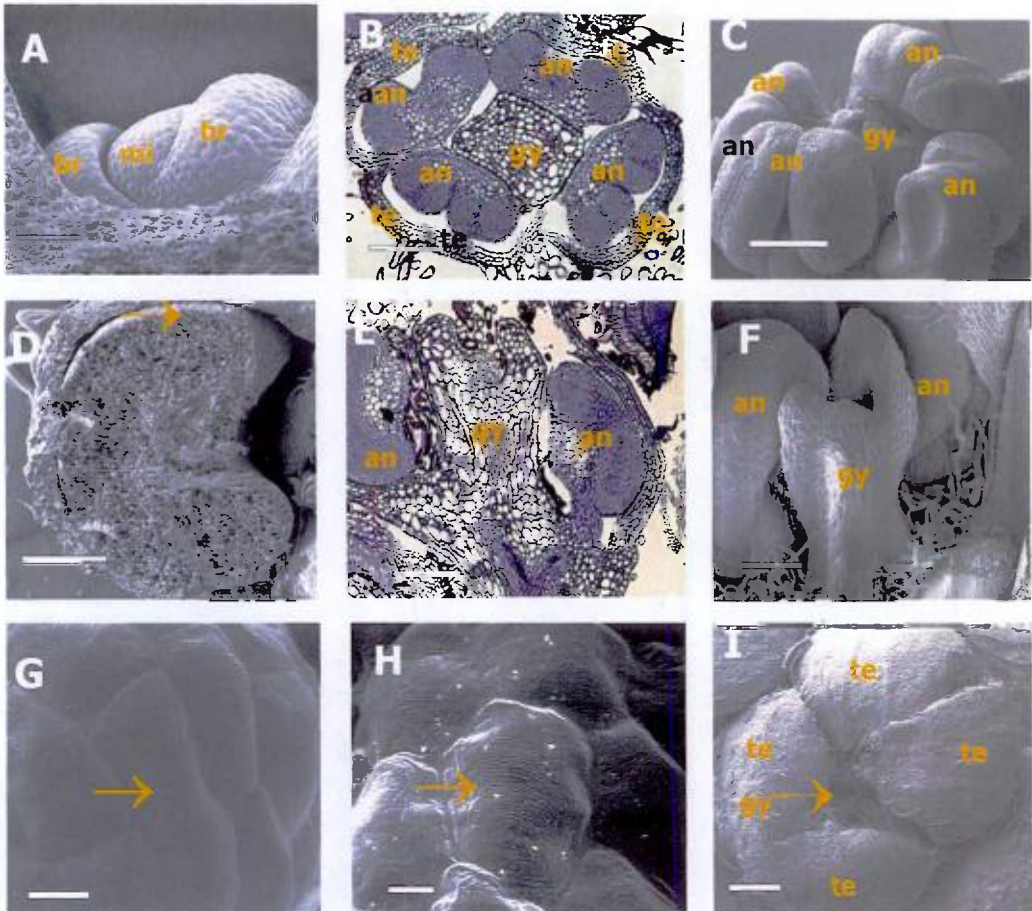
Chez la fleur exclusivement mâle, le développement des primordium du carpelle conduit à la formation d'un gynécée aberrant, parce que son développement est toujours avorté peu après le début de l'étape 7, en d'autres termes, au début de la différenciation de l'ovule (Figures 3E et 3F).

On peut observer la dégénérescence du gynécée en comparant les cellules enflées dans le carpelle en développement (Figure 3G) d'un méristème à l'étape 6 et pour des cellules ridées d'un carpelle en dégénérescence (Figure 3H) d'un méristème à l'étape 7. La fleur mâle dans l'anthèse (étape 8) est constituée de 4 anthères totalement recouvertes par 4 tépales et il est toujours possible d'observer, dans la partie centrale, les traces d'un gynécée aberrant (Figure 3I).

Chez les fleurs hermaphrodites du clone F1 la différenciation des anthères (étape 5), du carpelle (étape 6) et de l'ovule (étape 7) s'effectue comme dans les fleurs des variétés parentales avec la formation de la cellule mère du mégaspore (cmm) (Figure 4F) en laissant supposer que les deux organes sont utilitaires. Dans l'inflorescence de ce clone on peut observer la présence de fleurs mâles, femelles et hermaphrodites.

Dellaporta et Calderon-Urea (1994) ont déjà observé la formation du primordium des organes fertiles qui sont avortés avant de compléter le développement chez le maïs et Kater (2001) chez le concombre, ce qui suggère différents contrôles d'expression génique pour les deux organes.

Pour appuyer cette hypothèse, les hybridations *in situ* des gènes du modèle ABC ont été accomplies, en utilisant des sondes de gènes hétérologues d'*Arabidopsis* connus pour être impliqués dans la différenciation des organes floraux chez plusieurs espèces de plantes (Bowman et coll., 1989).



Des signes de l'expression des gènes *AP1* (Figure 5A), *AP3* (Figure 5B) et *AG* (Figures 5C et 5D), ont été observés chez les variétés Catânia Paulista (Figure 5B) et Formosa (Figures 5A, C et D). On a aussi observé l'expression de ces gènes, dans le clone IZ56/4 (donnés non publiés).

L'expression des gènes *AP1* et *AP3* chez le mûrier coïncide avec les données présentées par Irish (1999) chez *Arabidopsis*. Cependant, l'expression d'*AG* n'a été observée que dans les carpelles, il n'y a pas de signes de son expression dans les anthères chez aucun des types floraux (Figures 5C et D).

Ces résultats suggèrent qu'il existe une grande homologie des gènes pour les facteurs A et B du modèle ABC, entre *Arabidopsis* et *Morus*. L'absence d'observation de l'hybridation pour le gène *AG* (facteur C) dans les primordium des anthères, suggère un contrôle différent pour la différenciation des anthères et des carpelles, alors que chez *Arabidopsis* la différenciation de carpelles est seulement

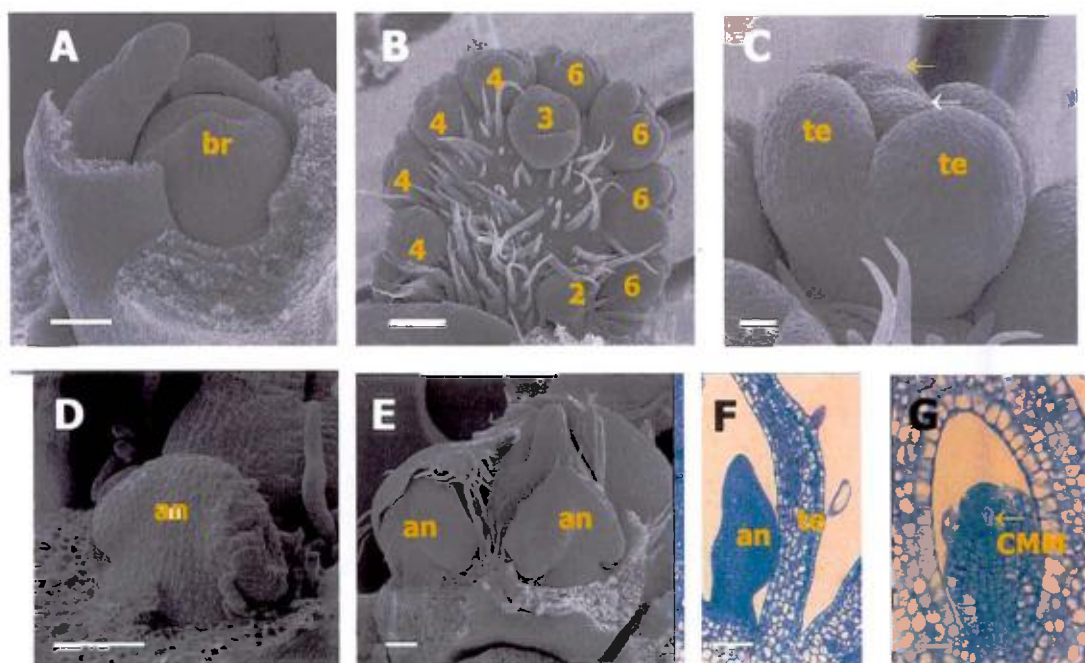


Figure 4 – Développement de la fleur hermaphrodite chez le clone IZ56/4 observé par microscopie électronique à balayage (A - E) et microscopie optique (F et G).

A : Méristème apical végétatif. Les primordiums floraux ont été retirés pour permettre de voir le méristème protégé par une bractée. **B :** Le méristème de l'inflorescence montrant le côté ventral. Noter les méristèmes floraux aux différentes étapes de développement (stades 2 à 6). **C :** Méristème floral à l'étape 6 du développement. On observe le début de la formation des primordiums des carpelles, une caractéristique de cette étape du développement. **D :** Le primordium d'anthère rond dans un méristème pendant les étapes 5 et 6. **E :** Fleur hermaphrodite après les étapes 6 et 7. On a retiré deux tépales pour permettre de voir des anthères et le gynécée au début de la fusion des carpelles pour la formation du style. Noter la forme de coeur des anthères, observée aussi en coupe histologique dans la figure suivante **F :** L'anthère coeuriforme en coupe longitudinale. **G :** Coupe histologique d'un méristème à l'étape 7 de développement. Notez la formation des téguments et la formation du nucelle avec la CMM.

Légende: an: anthère br: bractée; cmm: cellule mère du mégaspore; te: tépale. Barres: A: 10µm; B: 100µm; C: 20µm; D: 83µm; E: 60µm; F: 60µm; G: 20µm

Figure 4 - Development of the hermaphrodite flower in the IZ56/4 clone observed under scanning electronic microscopy (A- E) and optical microscopy (F and G).

A: Apical vegetative meristem. The floral primordium were removed so that the meristem protected by a bract can be seen. **B:** The meristem of the inflorescence showing the ventral side. Please note the floral meristems at the different stages of development (stages 2 to 6). **C:** Floral meristem during stage 6 of development. The beginning of the formation of the primordium of the carpels, a characteristic of this stage of development, can be observed. **D:** The round primordium of the anther in a meristem during stages 5 and 6. **E:** Hermaphrodite flower after stages 6 and 7. Two tepals were removed so that the anthers and the gynoecium at the beginning of the fusion of the carpels for the formation of the style can be seen. Please note the heart shape of the anthers, also observed in an histological section in the following figure. **F:** The heartshape anther in a longitudinal section. **G:** Histological section of a meristem during stage 7 of development. Please note the formation of the teguments and the formation of the nucellus with the CMM.

Legend: an: anther; br: bract; cmm: mother cell of the megaspore; te: tepal. Bars: A: 10 µm; B: 100 µm; C: 20 µm; D: 83 µm; E: 60 µm; F: 60 µm G: 20 µm

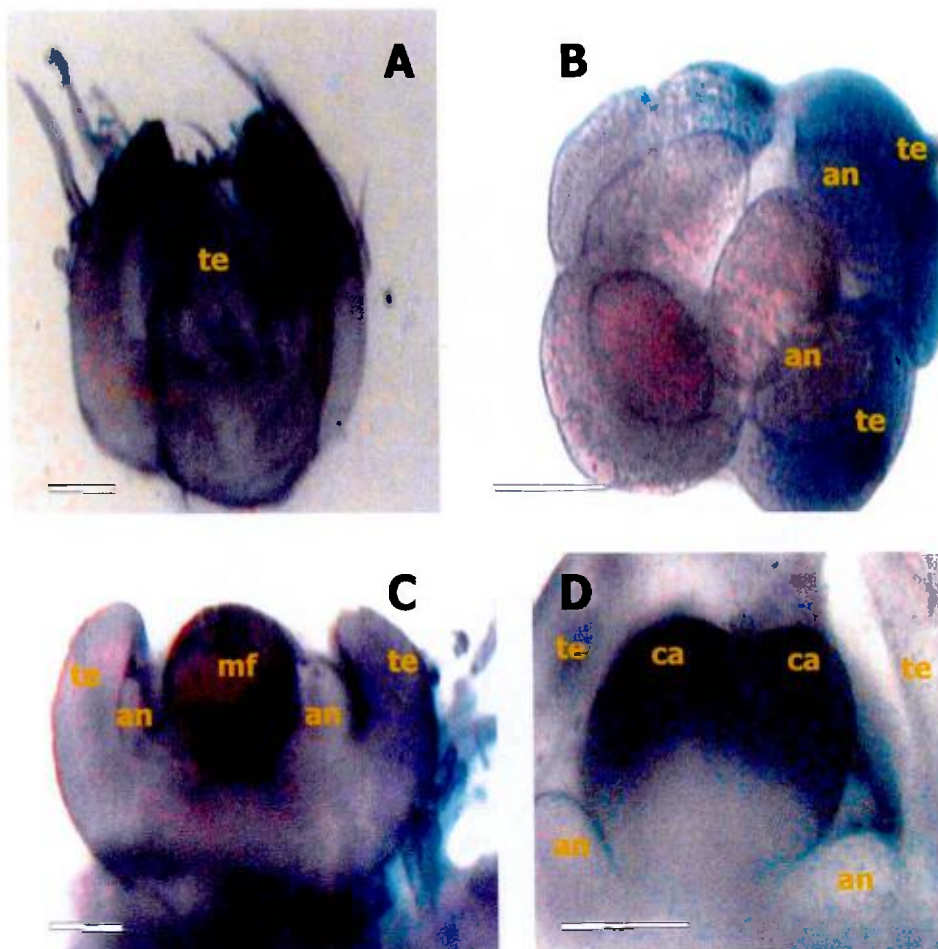


Figure 5 - Hybridation *in situ* du type "whole mount" sur les variétés Formosa (femelle) et Catania Paulista (mâle) pour détecter l'expression des homologues des gènes MADS.

Le signal de l'hybridation des ARNm est indiqué par la couleur violacée. Des sondes antisense ont été utilisées pour les gènes *APETALA 1* (AP1 - A); *APETALA3* (AP3 - B) et *AGAMOUS* (AG - C et D). A : Signal AP1 sur le tiers supérieur des tépales d'une fleur de la variété Formosa à l'étape 6. B : Signal AP3 sur le tiers supérieur de 3 tépales et 2 anthères d'une fleur de la variété Catânia Paulista au stade 5. C : et D : Deux fleurs de la variété Formosa, pendant le passage de l'étape 5 à l'étape 6, avec un signal fort de l'expression du gène AG sur les primordium du carpelle.

Légendes: **an**: anthère; **ca**: carpelle; **mf**: méristème floral; **te**: tépale. Barres: A: 35µm; B: 70µm; C: 42µm; D: 52 µm.

Figure 5 - In situ hybridization of the "wholemount" type on the varieties in Formosa (female) and Catania Paulista (male) for detecting the expression of the homologues of the MADS genes.

The signal of hybridization of the mRNAs is indicated by the purplish colour. Antisense probes were used for the *APETALA 1* (AP1 - A); *APETALA3* (AP3 - B) and *AGAMOUS* (AG - C and D) genes.

A: AP1 signal on the third upper part of the tepals of a flower of the Formosa variety during stage 6. B: AP3 signal on the third upper side of three tepals and two anthers of a flower of the Catania Paulista variety during stage 5. C: and D: Two flowers of the Formosa variety, during the transition from stage 5 to stage 6, with a strong signal of expression of the AG gene on the primordium of the carpel.

Legends: **an**: anther; **ca**: carpel; **mf**: floral meristem; **te**: tepal. Bars: A: 35 µm, B: 70 µm; C: 42 µm; D: 52 µm.

contrôlée par les gènes du facteur C et la différenciation des anthères par l'action concertée des gènes des facteurs B et C (Coen et Meyerowitz, 1991). La présence d'autres gènes pour le facteur C impliqués dans la différenciation du carpelle a déjà été observée chez le maïs (McSteen et coll., 2000) et suggérée pour l'ovule chez le pétunia (Angement & Columbus, 1996).

REMERCIEMENTS

Au Prof. E.W.Kitajima pour l'usage du microscope électronique à balayage au NAP/MEPA, ESALQ, USP

REFERENCES

- ANGEMENT G.C. & COLOMBO L. (1996) Molecular control of ovule development. *Trends Plant Sci.* 1: 228-232.
- BOWMAN J.L., SMYTH D.R. & MEYEROWITZ E.M. (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1:37-52.
- COEN, E.S. & MEYEROWITZ, E.M. (1991) The war of whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31-37
- DELLAPORTA S.L. & CALDERON-URREA, A. (1994) The sex determination process in maize. *Science* 266:1501-1505.
- DORNELAS M. C., VIEIRA, M.L.C. & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. (1992) Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. *Annals of Botany* 70: 477-482.
- DORNELAS M.C.; WITTICH, P.; VON RECKLINGHAUSEN, I.; VAN LAMMEREN, A. & KREIS, M. (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ask) multigene family. *Plant molecular biology* 39: 137-147.
- FONSECA T.C., ALMEIDA, J.E.; OKAMOTO, F. (1993). Le programme d'amélioration du murier dans l'Etat de São Paulo au Brésil - Sericologia, Lyon, França. 33(4) 623 - 630
- KOMAKI, M.K.; OKADA, K.; NISHINO, E. & SHIMURA, Y. (1988) Isolation and characterization of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in flower development. *Development* 104 195-203
- KRIZEK, BA AND EM MEYEROWITZ (1996) The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function *Development* 122: 11-22.
- MCSTEEN P., CHINGCUANCO, D.L. & COLASANTI, J. (2000) The floret by another name: control of meristem identity in maize. *Trends in Plant Science* 52: 61-66.
- MEYEROWITZ E.M.; BOWMAN, J.L.; BROCKMAN, L.L.; DREWS, G.N.; JACK, T.; et al (1991) A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* supplement 1, 157-167.
- RANGASWAMI G. et al., (1976) Manual in sericulture. Rome: FAO, (1976) v.1: Mulberry Cultivation, 107p. (Agricultural Services Buletin n.15)
- SCHMIDT E. D.L.; VAN HENGEL, A.J. & DE VRIES, S. C. (1996). A rapid method for localizing cell-specific transcripts in plant cell cultures. *Biochemica* 4: 25-28.
- THEISSEN G. ET AL. (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42: 115-149.
- YANOFSKY M.F.; BOWMAN, J.L.; DREWS, G.N.; FELDMANN, K.^a; MEYEROWITZ, E.M. (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resemble transcription factors. *Nature* 346 35-39

COMPARATIVE STUDY OF THE SEXUAL EXPRESSION IN MULBERRY, *MORUS ALBA* L. - FLORAL DEVELOPMENT

T. C. FONSECA¹, J. E. ALMEIDA², G. BANDEL³ & M. C. DORNELAS⁴

1. Instituto de Zootecnia, APTA, Rua Heitor Penteado, 56 CEP 13, 460-000 Nova Odessa, SP, Brésil, Email : tfonseca@iz.sp.gov.br
2. UDPGalia, APTA Regional, CP CEP 17, Galia, SP Email : updgalia@aptaregional.sp.gov.br
3. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP – Departamento de Genética, Avenida Pádua Dias, 11, CP 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brésil, Email : gbandel@esalq.usp.br
4. Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP – Av. Centenario, 303, - CEP 13400-961, Piracicaba, São Paulo. Email : mcdornel@cena.usp.br

A comparative study of the development of the floral organs in 3 mulberry clones, Catania Paulista, Formosa and IZ56/4's F1 was undertaken through the morphological observations by scanning electronic microscopy and optical microscopy and through the in situ hybridizations by using Arabidopsis API, AP3 and AG (ABC model) heterologue genes as probes.

INTRODUCTION

The studies on the floral structure were started from the observation of floral forms and of floral diagrams of mutants found in the nature. Two plants were chosen as models for these studies: *Arabidopsis thaliana* and *Anthirrhinum majus* because of the numerous mutants available and because they are easily grown (Coen and Meyerowitz, 1991, Meyerowitz *et al.*; 1991).

From these studies, the existence of 3 factors whose isolated or combined action is responsible for the identity and the position of the floral organs was established. These factors belong to 3 groups of homeotic genes, which mainly belong to the MADS family (A, B and C groups) and to transcription factors. This pattern was called the ABC pattern (Coen and Meyerowitz, 1991)

In the group of plants with flowers, angiosperms possess, in their majority, flowers made up of 4 whorls (circles of organs); two outer ones containing only sterile organs, sepals in the first one and petals in the second one; and two inner whorls, containing the fertile organs, the stamens in the third one and the carpels in the fourth one.

Each group of the model is expressed in two adjacent whorls. Therefore, the expression of the genes of the A group is expressed in the whorls one and two, of the B group in the whorls three and four and from the C group in the whorls three and four.

The formation of the sepals is ensured by the isolated expression of the genes of the A group, the formation of the petals is ensured by the combined expression of the genes of the A and B groups; the formation of the stamens is ensured by the combined expression of the genes of the B and C groups and the formation of the carpel is ensured by the isolated expression of the genes of the C group. The fact that the activities of the genes from the A and C groups are mutually excluded and that the genes from the C group define the floral meristem is also planned in the model.

The biotechnology tools have also made it possible to test, on the molecular basis, the ABC model, mainly founded on morphological evidences. These genes were identified, cloned and sequenced: the genes from the A group, *APETALA1* (*API*) and *APETALA2* (*APA2*) (Komaki *et al.*, 1988), the genes from the B group, *APETALA3* (*AP3*) and *PISTILLATA* (*PI*) (Krizck and Meyerowitz, 1966) and from the C group, *AGAMOUS* (*AG*) (Yanofsky *et al.*, 1990; Theissen *et al.*, 2000).

The ABC model was tested for several plants, from angiosperms to gymnosperms (Theissen *et al.*, 2000) and nearly completely all the aspects of the formation of the model of the floral development in the plants and the conservation of this model during the evolution are explained by this model.

The achievement of a mutant clone during the development of a program for the improvement of mulberry *Morus alba* L. (Fonseca *et al.*, 1993) raised a lot of interest. Developed approximately in 1965, this project aimed at increasing the productivity of Brazilian sericulture through crosses between imported varieties and native varieties (Fonseca *et al.*, 1993) possessing in their totality, unisexual flowers, which characterizes them as dioecious plants.

Within this project, clones were obtained in which two new characteristics were observed: the presence of monoecious characters, that is to say male, female and hermaphrodite flowers on a same plant and the influence of the environment on the sexual expression of these clones.

From the results obtained by Coen and Meyerowitz (1991) who tried to explain, from the genetical point of view, these new floral models in mulberry, we started a comparative study between two varieties, one only yielding male flowers, the variety Catania Paulista and the other one only yielding exclusively female flowers, the Formosa variety, and a clone from the cross between these two varieties (IZ56/4) bearing male, female and hermaphrodite flowers. For this study, it was necessary not only to characterize these clones morphologically but also to study their floral development and the expression of the genes which are also probably involved in this process.

MATERIALS AND METHODS

Comparative studies between mulberry varieties presenting dioecious characteristics (Formosa which presents female dichlamydeous flowers and Catania Paulista presenting male dichlamydeous flowers) and the IZ56/4 clone coming from this cross and presenting male and female dichlamydeous and monochlamydeous flowers, which are the characteristics of a monoecious plant were undertaken.

In this first stage of study, the morphological observations were proceeded to through scanning electronic microscopy and optical microscopy. In this aim, inflorescences at different stages of their development were chosen and they were vacuum fixed in a 4% paraformaldehyde solution during 24 hours, dehydrated in increasing serial ethanol concentrations up to 100% and kept in the refrigerator at 4° C.

Preparation of the inflorescence for the microscopic analysis:

1) Scanning:

The inflorescences were dissected in 100% ethanol under an Olympus binocular lens, dried to critical point with CO₂, mounted on an aluminium stub, recovered with colloidal gold and were observed by scanning electronic microscopy under DSM940 LEO of NAP/MEPA in ESALQ/USP.

2) Optical:

The inflorescences were embedded in plastic resin, historesin (Leica); in this aim they were treated in a series of historesine from 30 to 100%, polymerised at room temperature (25° C) during 48 hours and were fixed to a wooden base for preparing sections with microtome. The 5µm sections were stuck on glass slides and dried at 50° C. After being dried, the sections were coloured with toluidine blue (Dornelas *et al.*, 1992) for the subsequent observation with the Zeiss Axiovert 35 microscope of the Laboratorio de Biotecnologia Vegetal, CENA/USP.

In situ hybridisation:

The inflorescences were put, during the appropriate development stages for the *in situ* hybridization in 4% paraformaldehyde, during 24 hours under vacuum, were dehydrated in a series of ethanol up to 100% and were put in the freezer (-20° C).

The *in situ* hybridization was carried out based on the description of Dornelas *et al.*, (1999) and Schmidt *et al* (1996) excepted for the washes which were as follows: two washes in $4 \times$ SSC at 37°C during 20 minutes each, followed by two washes in $2 \times$ SSS in the same conditions.

The probes of the *APETALA 1* (*AP1*), *APETALA 3* (*AP3*) and *AGAMOUS* (*AG*) genes of *Arabidopsis thaliana* (table below) were prepared and a digoxigenic marking (DIG-UTP) was carried out by using the KitT7/SP6 (Roche, Germany).

Gene	Origin	Plasmid
AP1	Dr Martin Yanofsky, University of the California, La Jolla, USA	pKy89
AP3	Dr Tom Jack, Dartmouth College, New Hampshire, US	pD1136
AG	Dr Martin Yanofsky, University of California, La Jolla, USA	PCIT565

RESULTS AND DISCUSSION

The development was characterized in nine stages (Table I) in order to carry out the study of the floral ontogeny in mulberry.

Characterization of meristems and formation of the inflorescence:

Stage 0 (zero) represents the vegetative meristem which produces the leaves and is protected by them (Figures 1A, B, 3A and 4A). Stage 1 is characterized by the transition to the inflorescence of the meristem (Figures 1C and 4A) when the vegetative meristem stops producing leaves and starts the production of the meristems of the inflorescence which are formed at the basis of the leaf and are protected by bracts during all the floral development (Figures 1C and 1F).

Small groups of cells in division are localized according to a standardized model on the meristem of the inflorescence and formed floral meristems (Figures 1C) at the beginning of stage 2. It is possible to distinguish two different sides in the inflorescence, the ventral or adaxial side (Figure 1^E – on the right) and the dorsal or abaxial side (Figure 1^E – on the left) thanks to the acropetal model of arrangement, of floral meristems in relation to the axis of the meristem of the inflorescence. The meristem is characterized by the formation of a floral primordium in the terminal portion.

Development of the flower:

The floral primordium developed in a similar way in the three varieties studied either if they produce exclusively female (Formosa – dioecious) or exclusively male flowers as well as for the hermaphrodite flower of the hybrid clone IZ56/4 (monoecious cultivar). Floral characteristics belonging to the two parents were present in F1 during which hermaphrodite flowers were formed like those observed in the IZ56/4 clone whose floral primordium was differentiated during the same stages.

The first signs of the beginning of the differentiation of the floral organs were observed by the presence of cell divisions in the L1 and L2 layers towards the formation of the first floral organ of the abaxial tepal (Figures 1D, 2A and 4B) at the beginning of stage 3 of development, then towards the formation of the adaxial and lateral tepals (Figures 1D, 2B and 4B) during the completion of the stage 4.

The differentiation of the primordium of the fertile organs, stamens and carpels showed respectively the beginning of stages 5 and 6. On the internal basis of the primordium of the tepals, cell divisions, in the L1 and L2 layers, indicated the formation of the stamens. In the exclusively female flower, the differentiation of the primordium of the stamens was stopped, the male organs did not complete their development.

This interruption in their development was not standardised, it could happen at very different times and that was what gave the origin to the flowers which did not own any trace of stamen, with primordium of different dimensions but which did not complete their development (Figure 2F). In

male or hermaphrodite flowers, the development of stamens progressed normally, and reached the complete differentiation with the formation of 4 stamens (Figures 3B and 3C) producing a big quantity of pollen (Figure 3D). The constant model of 4 anthers in exclusively male flowers of the Catania Paulista variety and in the hermaphrodite flowers of the IZ56/4 clone which presented 1 to 4 stamens was observed. The other interesting characteristic of the hybrid clone was the formation of two shapes of anthers, the round type (Figure 4D) which was also found in the male progeny and the heart-shape type (Figure 4E and 4F) only observed in the hybrid.

The differential development of the two primordium of the carpels (Figures 2D and 2E) showed the beginning of stage 7. These carpels underwent a post-genital fusion to form the ovary (Figure 2F) where the primordium of the ovule (Figure 2F) will be formed on the internal side of the shortest carpel (Figure 2G). The fusion of carpels continued until it formed a style which length depended on the species and this variation was used by Koidzume (Rangaswami *et al.*, 1976) for dividing the *Morus* genus in two groups: the Dolichostylae (short or absent style) and the Macromorus (long style). *Morus alba* is likely to belong to the second group. The female flower was formed by four tepals totally protecting the ovary but exposing the style and the sigma (Figure 2I).

In the exclusively male flower, the development of the primordium of the carpel lead to the formation of an aberrant gynecium because its development was always aborted not long before the beginning of stage 7, in other words, at the beginning of the differentiation of the ovule (Figures 3E and 3F).

The degeneration of the gynecium could be observed by comparing the swollen cells in the developing carpel (Figure 3G) of a meristem during stage 6 and the wrinkled cells of a degenerating carpel (Figure 3H) of a meristem at stage 7. The male flower during the anthesis (stage 8) was made up of 4 anthers totally recovered by 4 tepals and it was always possible to observe, in the central part, the traces of an aberrant gynecium (Figure 3I).

In the hermaphrodite flowers of the F1 clone the differentiation of the anthers (stage 5), of the carpel (stage 6) and of the ovule (stage 7) took place like in the flowers of the parental varieties with the formation of the mother cell of the megaspore (cmm) (Figure 4F) which leaves to believe that the two organs are useful. In the inflorescence of this clone, the presence of male, female and hermaphrodite flowers could be observed.

Dellaporta and Calderon-Urea (1994) had already observed the formation of the primordium of the fertile organs which were aborted before completing their development in corn and Kater (2001) in cucumber, which suggests different controls of the genic expression for the two organs.

To support this hypothesis, the *in situ* hybridizations of the genes of the ABC model were carried out, by using the probes of the heterologous genes of *Arabidopsis* known to be involved in the differentiation of the floral organs in several plant species (Bowman *et al.*, 1989).

Signs of expression of *AP1* genes (Figure 5A), *AP3* (Figure 5B) and *AG* (Figures 5C and 5D) were observed in Catania Paulista (Figure 5B) and Formosa (Figures 5A, C and D). The expression of these genes was also observed in the IZ56/4 clone (data not published).

The expression of *AP1* and *AP3* genes in mulberry coincided with the data presented by Irish (1999) in *Arabidopsis*. However, the *AG* expression was only observed in the carpels, there was no sign of its expression in the anthers of any floral type (Figures 5C and D).

These results suggest that there is a great homology of the genes for the A and B factors in the ABC model, between *Arabidopsis* and *Morus*. The absence of observation of any hybridization for the *AG* gene (factor C) in the primordium of the anthers, suggests a different control for the differentiation of the anthers and of the carpels whereas in *Arabidopsis*, the differentiation of carpels was only controlled by the genes of the C factor and the differentiation of anthers by the concerted action of the genes of factors B and C (Coen and Meyerowitz, 1991). The presence of the other genes for the factor C involved in the differentiation of the carpel was already observed in corn (McSteen *et al.*, 2000) and suggested for the ovule in petunia (Angement & Columbus, 1996).

POSSIBLE ROLES OF MYROTOXIN B PRODUCED BY PATHOGEN OF MYROTHECIUM LEAF SPOT OF MULBERRY

R. MURAKAMI¹ & A. SHIRATA

1. National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2, Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

*Myrotoxin B is a main pathotoxin produced by **Myrothecium roridum** which is the fungal pathogen of the **Myrothecium** leaf spot. So far, the roles of the toxin in the pathogenicity of the fungus were unclear, therefore, we examined the time course of myrotoxin B production by **M. roridum** on mulberry leaves, the effects of the toxin on infection rate of the fungus for mulberry leaves, the role as a suppressor of the toxin to resistance of mulberry leaves against invasion of fungi, the relationship between the toxin production of **M. roridum** strains producing myrotoxin B and their virulence, and compared the sensitivity of susceptible mulberry cultivars and resistant cultivars leaves against the disease to the toxin. In the present study, myrotoxin B was produced on mulberry leaves by **M. roridum** within 20 h after the inoculation. Although conidia of the fungus alone did not infect the mulberry leaves, it did when 10^6 ppm or more of myrotoxin B was mixed with them. Avirulent fungi to mulberry leaves infected the leaves when myrotoxin B was dropped on the leaves before the inoculation. The strains of **M. roridum** producing myrotoxin B which exhibited high virulence to mulberry leaves showed high toxin productivity, and smaller necroses were caused to mulberry resistant cultivars even by dropping the toxin than susceptible cultivars. The results suggested that myrotoxin B plays roles as infection factor and virulence factor of **M. roridum**.*

Keywords: *Myrothecium roridum*, *Myrothecium* leaf spot, mulberry, myrotoxin B, pathogenicity, virulence.

INTRODUCTION

Myrotoxin B (Fig. 1) primary mycotoxin metabolites of *Myrothecium roridum* Tode ex Fries causes leaf spot of mulberry *Morus alba* and *M. bombycis* (Murakami *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1994), belongs to trichothecenes which are chemically related group of sesquiterpenoid epoxides. However, their function in the fungus producing them is not obvious.

We have reported preliminary findings on detection of myrotoxin B in mulberry leaves inoculated with *M. roridum* strain M9403 and the existence of the toxin as a primarily pathotoxin in the leaves (Murakami *et al.*, 2004). However, the roles of the toxin in the pathogenicity of *M. roridum* were not verified. In the present study, therefore, we conducted *in vitro* experiments to investigate the function of myrotoxin B in the pathogenicity of *M. roridum* strain M9403: 1) time course over 48 h of myrotoxin B production by the strain conidia on mulberry leaves; 2) the effects of the toxin on infection of the strain conidia to mulberry leaves; 3) the role of the toxin as a suppressor on mulberry leaves; 4) the relationship between the toxin productivity of *M. roridum* and their virulence and 5) the assay of the cultivar-specific responses of mulberry to the toxin.

MATERIALS AND METHODS

Mulberry leaves preparation:

Mulberry cultivar "Shin ichinose" was grown in the mulberry field of the National Institute of Agrobiological Sciences (Tsukuba, Japan). The leaves of the cultivar were used unless we mention of it. The field was ploughed up to control weeds and the soil was determined to be free from *M. roridum*. Mulberry leaves were harvested at approximately 30 cm below the top of the branches and sterilized with 70% ethanol. The leaves were punctured with a bundled 10 needles (punctured part).

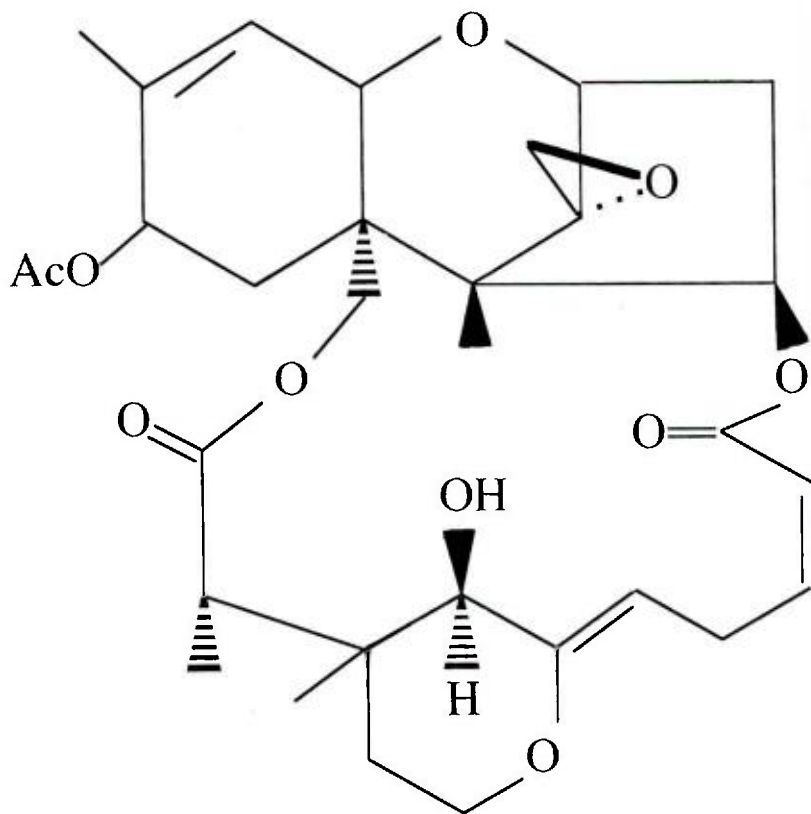


Figure 1. Chemical structure of myrotoxin B (Murakami *et al.*, 1999a)

Figure 1. Structure chimique de la myrotoxine B (Murakami *et coll.*, 1999a).

Fungal strain and culture:

M. roridum strain M9403 isolated from the mulberry leaves (Murakami and Shirata, 1998a) was incubated on the Potato Sucrose Agar medium (PSA: 2% sucrose and 1.8% agar in 20% potato broth) at 25° C for two weeks. Prior to the conidial inoculation, conidia were collected from the culture and

were washed with sterilized distilled water (SDW) three times to avoid contamination of any mycotoxins secreted by the fungus (washed conidia).

Myrotoxin B:

Myrotoxin B was purified by the method of Murakami *et al.* (1999). The strain M9403 was incubated on PSA at 25° C for one month, and myrotoxin B was isolated from the culture filtrate using the high performance liquid chromatography (HPLC, LC 10A, Shimadzu, Kyoto).

Detection of myrotoxin B within 48 h after inoculation of *M. roridum*:

The mulberry leaf pieces were cut into 1 × 1 mm size, were soaked in the conidial suspension of M9403 (5×10^5 conidia/ml) and were incubated at 25° C for 48 h. At intervals of two hours after the treatment, the leaves were removed, dried and soaked in 20 ml of methanol with 90 rpm for one hour. This extraction was repeated three times. The resultant extract was evaporated and was dissolved in 100 µl of methanol. HPLC separation of 20 µl extracts was carried out with a LC10A solvent delivery system with an ODS-II column (4.6 mm × 15 cm, Shimadzu Techno-Research, Kyoto). Since myrotoxin B was eluted at 20.0 min with 50% of aqueous methanol (flow rate at 1 ml/min) at 40° C (Murakami *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2004), the fractions eluted at the retention time of 19.8 - 20.3 min were sampled by the same method. The sampled fraction was evaporated, dissolved with 20 µl of 0.1% methanol and then was dropped onto three punctured parts on mulberry leaves to assay toxic activities of myrotoxin B. As a control, 20 µl of 0.1% of methanol was dropped onto additional punctured parts on the same leaves, and it did not affect the leaves.

When an extract with toxic activity was dropped on mulberry leaf, necrosis occurred. Toxic activity was evaluated by the extent of necrosis on the treated part. The longitudinal lengths (LL) and vertical lengths (VL) of the necrosis were measured seven days after the treatment. This experiment was replicated three times.

Examination of myrotoxin B effects on infection rate of *M. roridum* conidia:

Myrotoxin B solution ($5 \mu\text{l}$, 10^{-8} - 10^{-3} ppm of myrotoxin B in 0.1% methanol with 10 ppm series and 0.125 - 1.9×10^{-3} ppm with two-fold dilution stepwise) was dropped on 100 punctured parts on mulberry leaves. After the solution was dried, 10 µl of conidial suspension of the strain M9403 (10^6 conidia/ml in SDW) was dropped on these parts. As a control, 10 µl of 0.1% methanol was dropped on the punctured parts before the conidial suspension was done.

When the leaves were infected with the fungus, hyphae and sporodochium of the fungus were formed on lesions on the leaves. Each infection rate of the fungus was checked seven days after the inoculation. This examination was replicated three times.

Assay of function as a suppressor of myrotoxin B on mulberry leaves:

Since myrotoxin B exhibited antifungal activity against other than the genus of *Myrothecium* (Murakami *et al.*, 1998b; Nespiak *et al.*, 1961), fungi having tolerance to the toxin and avirulence against mulberry leaves were collected from mulberry leaves in Kyoto Pref., Fukushima Pref. and Ibaraki Pref.

First, 100 pieces of healthy leaves were harvested and 10 parts were punctured per leaf, and 10 µl of myrotoxin B (5 ppm) was dropped on the parts. Fungi appearing on the necroses were selected as tolerant fungi to the toxin, and monoconidial or monohyphal isolations for each fungus were conducted.

Second, the selected fungi were incubated on PSA for a week and hyphal piece (3 × 3 × 3 mm) from the culture was inoculated on punctured parts of mulberry leaves. Ten days after the inoculation, fungi which did not cause lesions on mulberry leaves were selected as avirulent fungi to mulberry leaves.

Three inocula of the selected fungi were inoculated on three punctured parts on a mulberry leaf; 1) hyphal piece of the fungi, 2) 10 µl of myrotoxin B (0.03 ppm, the concentration of myrotoxin B did not cause necroses on mulberry leaves), 3) the inoculum 1) was inoculated after dropped inoculum 2) was dried. Infection of the fungi on mulberry leaves was evaluated by detection of lesions and reisolation of the inoculated fungi.

Assay of myrotoxin B productivity of *M. roridum* strains and their virulence:

A: selection of strains producing myrotoxin B:

M. roridum strains collected from 14 prefectures of Japan were incubated on mulberry leaf agar medium (MA: 25g of agar in 15% dried mulberry leaf broth) in a petri dish (4 cm in diam.) at 25 °C for seven days. The cultures were dried and were shaken with 2 ml of methanol at 40 rpm for an hour. Forty micro liters of the extracts and myrotoxin B (10 µl, 5 ppm) were dropped on thin layer chromatography (TLC) plate (DC-Alufohlen Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt). The plate was developed with diethyl ether and then conidia of susceptible strain M 9401 to mycotoxins produced by *M. roridum* were sprayed on the plate (TLC-bioassay method, Murakami *et al.*, 1998a). Strains producing toxic component having the same R_f value as that of myrotoxin B were selected as strains producing myrotoxin B or similar toxic components to it.

B: evaluation of productivity of *M. roridum* strains:

The mycotoxin productivity of the selected strain was evaluated by the expansion of necrosis by applying culture filtrate of each strain on mulberry leaves. The selected strains were incubated on MA for 10 days. The incubation and extraction of toxic components from the cultures were conducted under the same conditions as section A. Each resultant extract was dried and then dissolved with 2 ml of 0.1% methanol. The solution (5 µl) was dropped onto three punctured parts on mulberry leaves. LL and VL of the necrosis were measured seven days after the treatments, and myrotoxin B productivity of each strain was evaluated by the expansion of the necrosis (LL × VL).

C: virulence assay of *M. roridum* strains:

Virulence assay was evaluated from the lesion development by conidial inoculation of the strains on mulberry leaves. Washed conidia of each strain were suspended in 1/2-fold concentration mulberry leaf broth medium (1/2-M; 17.5% dried mulberry leaf broth). Each 10 µl of a conidial suspension (2×10^6 conidia/ml in 1/2-M media) was dropped onto three punctured parts on leaves. LL and VL of lesions were measured seven days after the treatments.

Assay of cultivar-specific response in mulberry to myrotoxin B and *M. roridum*:

To investigate sensitivity of mulberry cultivars against *M. roridum* by treatment of myrotoxin B, six resistant cultivars (Aotago, Hosoe, Itouwase, Kanzanso, Sugudate, Tsurugisannso and Yamatowase) that caused small lesions and six susceptible cultivars (Inaguwa, Keikanso, Kyoukoku, Ochii, Ousyuguwa, and Seijuro) that had large lesions by inoculation of the strain M9403 (Murakami *et al.*, 1995) were harvested, and were cut into 3 × 3 cm pieces. Five micro liters of 10 ppm or 1 ppm of myrotoxin B (in 0.1% of methanol) was dropped onto three punctured parts on the piece. LL and VL of the necroses were measured four days after the treatment.

RESULTS

Detection of myrotoxin B from mulberry leaves inoculated with *M. roridum*:

Colour of the leaf pieces were slightly changed from green to brownish green by the inoculation with the strain M9403, and *M. roridum* was isolated from the inoculated pieces.

No necrosis occurred until 18 h, but it did 20 h after the inoculation (Table I), and percentage of necrosis emergence (PNE) increased as the time (ex. 0.56 mm² and PNE = 55.6 % after 24 h,

0.89 mm² and PNE = 66.7 % after 30 h). PNE was 100 % 34 h after the inoculation. Area of necroses depended on time passed ($p < 0.001$ at ANOVA).

Table I. Time course of myrotoxin B production by *Myrothecium roridum* on mulberry leaves.

*Tableau I. Cinétique de la production de la myrotoxine B par *Myrothecium roridum* sur les feuilles de mûrier.*

Hours ^{a)}	Area of necrosis (mm ²)	Percentage of emergence of necrosis ^{b)}
Heures ^{a)}	Surface de la nécrose (mm ²)	Pourcentage d'émergence de la nécrose ^{b)}
0	-	0
2	-	0
4	-	0
6	-	0
8	-	0
10	-	0
12	-	0
14	-	0
16	-	0
18	-	0
20	+ ^{c)}	33.3 ± 0
22	+	55.6 ± 9.1
24	0.56 ± 0.17 ^{d)}	55.6 ± 9.1
26	0.67 ± 0.16	66.7 ± 15.7
28	0.78 ± 0.14	77.8 ± 9.1
30	0.89 ± 0.10	66.7 ± 15.7
32	0.78 ± 0.41	77.8 ± 9.1
34	0.89 ± 0.10	100
36	1.0 ± 0	100
38	1.1 ± 0.10	100
40	1.2 ± 0.14	100
42	1.7 ± 0.16	100
44	2.3 ± 0.22	100
46	2.3 ± 0.22	100
48	3.0 ± 0.22	100

Extracts from the mulberry leaves inoculated with *M. roridum* conidia were fractionated by the high performance chromatography. The fractions with the same retention time as that of myrotoxin B were dropped on mulberry leaves. / Les extraits des feuilles de mûrier inoculées avec les conidies de *M. roridum* sont fractionnés par chromatographie sous haute pression. Les fractions avec le même temps de rétention que celui de la myrotoxine B sont déposées sur les feuilles de mûrier.

a) Hours after inoculation with *M. roridum* conidia on mulberry leaves. / a) Heures après l'inoculation des feuilles de mûrier avec les conidies de *M. roridum*.

b) The data of three replicate tests were averaged percentage and standard errors calculated. / b) Les données des test des trois répétitions sont les pourcentages moyens et les écarts types calculés.

- : non-reaction / non-réaction.

+ necrosis was caused at inoculated part / la nécrose a lieu sur la partie inoculée.

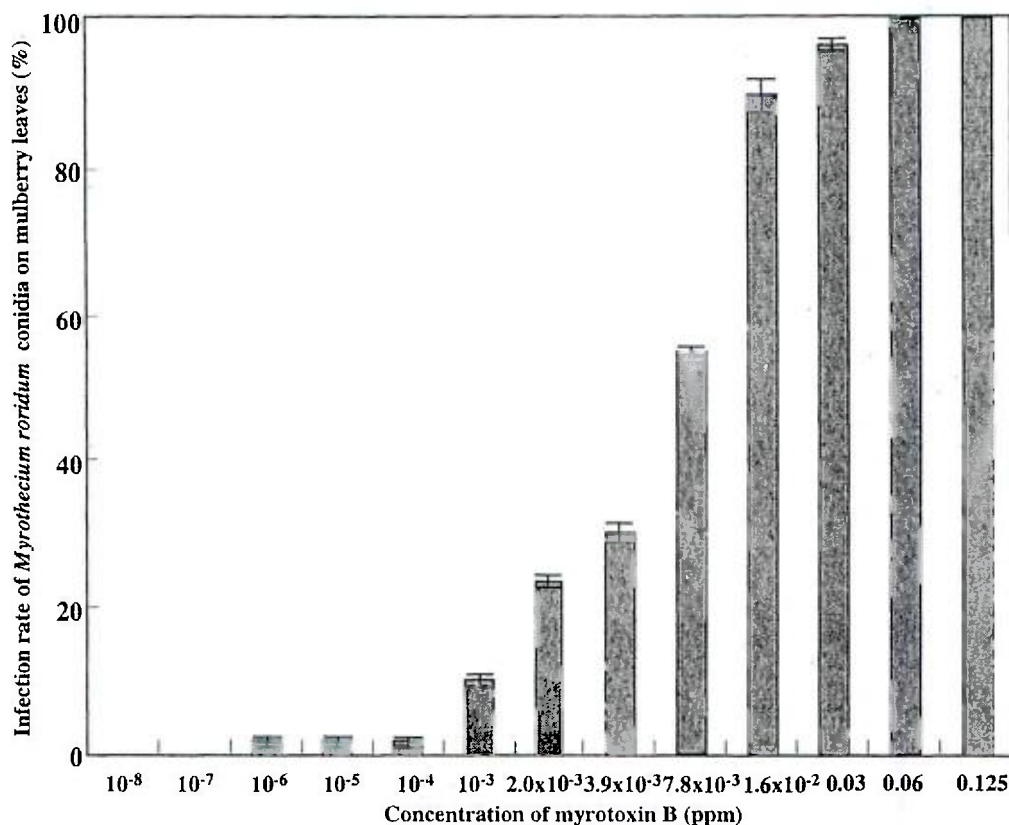


Figure 2. Effects of myrotoxin B on infection rate of *M. roridum* conidia in mulberry leaves. Each value represents the mean of three replicates. Bars in figure show standard errors of average percentage.

Figure 2. Effets de la myrotoxine B sur le taux d'infestation des conidies de *M. roridum* sur les feuilles de mûrier. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions. Les barres dans la figure montrent les écarts types pour le pourcentage moyen.

Effects of myrotoxin B on infection rate of *M. roridum*:

When M9403 conidial suspension with 0.1 % of methanol was inoculated on mulberry leaves as a control, the infection rate (IR) of the fungus was 0%. IR were 0% when conidial suspension with 10^{-8} ppm and 10^{-7} ppm of myrotoxin B were dropped on mulberry leaves (Fig. 2). When the conidial suspension with 10^{-6} ppm of the toxin was dropped, *M. roridum* infected the mulberry leaves (IR = 1.7 %). The infection rate increased with 10^{-6} ppm of the toxin to 0.06 ppm ($p < 0.001$, at ANOVA). For example, with 10^{-3} ppm of the toxin, 10.0%, with 7.8×10^{-3} ppm, 55.0%, and with 0.03 ppm, 96.7%, respectively. With 0.06 ppm and more of the toxin, IR were 100%.

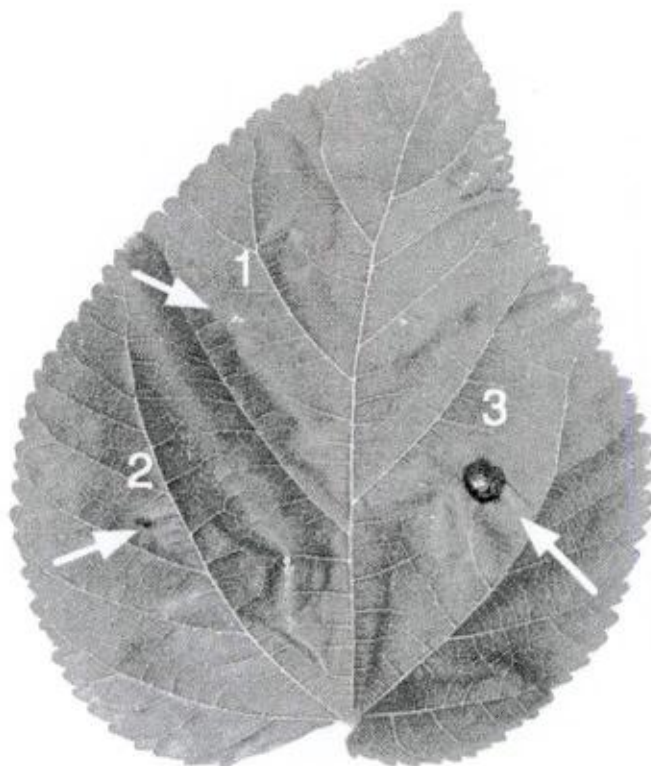


Figure 3. Function of myrotoxin B as a suppressor to resistance of mulberry leaf against invasion of fungi.

1. Avirulent fungus strain M99029 from Ibaraki prefecture, 2. Myrotoxin B at 0.03 ppm, 3. The avirulent fungus was inoculated after inoculated myrotoxin B at 0.03 ppm was dried. Photograph was taken at four days after the treatment.

Figure 3. Fonction de la myrotoxine B comme suppresseur de la résistance de la feuille de mûrier contre l'invasion par les champignons.

1. Souche de champignon M99029 avirulente de la préfecture d'Ibaraki, 2. Myrotoxine B à 0,003 ppm, 3. Le champignon avirulent est inoculé après que la myrotoxine B à 0,003 ppm inoculée ait séché. La photographie est prise quatre jours après le traitement.

Function of myrotoxin B as a suppressor:

Forty-three, 56 and 63 strains of avirulent fungi having tolerance to myrotoxin B were collected from Fukushima Pref., Ibaraki Pref. and Kyoto Pref. respectively. Two, 10 and one fungi from each location caused lesions after the toxin treatment at inoculation parts (Fig. 3) and each fungus formed hyphae of each strain on the lesions.

Relationship between myrotoxin B productivity of *M. roridum* strains and their virulence:

The colour of TLC plates is white and that of hyphae of M9401 is black. Therefore, the colour of the area on the plate where the mycotoxins exist looked white and where it is absent it was black.

It was confirmed that the 70 isolated strains produced many kinds of mycotoxins from the result that many spots showing antifungal activity were detected by TLC-bioassay method. To investigate the relationship between mycotoxin productivity and virulence of *M. roridum* strains, the mycotoxin productivity and virulence of the 70 strains were assayed, and the correlation coefficient between them was 0.41.

In the 70 strains, 36 strains producing myrotoxin B were selected. To investigate the relationship between myrotoxin B productivity and virulence of the strains producing myrotoxin B, myrotoxin B

productivity and virulence of the strains were assayed, and the correlation coefficient between them was 0.67 (Fig. 4).

Specific response in mulberry cultivars to myrotoxin B:

Treated with 10 ppm of myrotoxin B to susceptible cultivars to M9403, overall necroses on the applied parts had an average area of 270 mm^2 and for resistant cultivars, the average area was 254 mm^2 . There was no significant difference in the area of necrosis between resistant cultivars and susceptible ones.

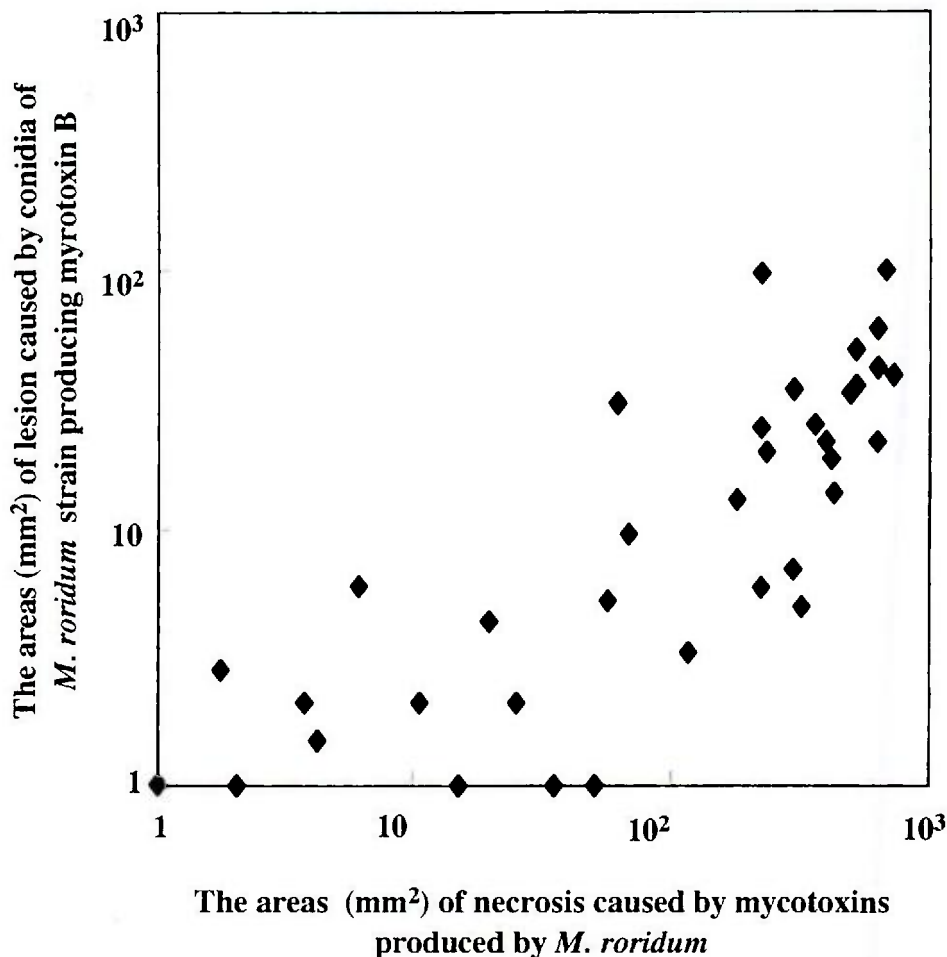


Figure 4. Relationship between necroses caused by the filtrates of strains producing myrotoxin B and their virulence. Areas of necroses caused by mulberry agar medium filtrate of the strains and areas of lesions caused by their conidia suspended in 1/2-fold concentration mulberry leaf broth medium.

Figure 4. Relation entre les nécroses provoquées par les filtrats des souches produisant la myrotoxine B et leur virulence. Zones des nécroses provoquées par le filtrat du milieu agar de mûrier et zones des lésions provoquées par les conidies en suspension dans un milieu de bouillon de feuilles de mûrier dilué deux fois.

However, when 1 ppm of the toxin was applied to the leaves, necroses by the toxin had an average area of 92 mm² on susceptible cultivars, and 22 mm² on resistant ones, respectively (Fig. 5). Necrosis area on susceptible cultivars was significantly larger than those on resistant ones (Student's *t*-test; *p* = 0.02).

DISCUSSION

Pathotoxins of phytopathogens are divided into two main categories depending on their roles: pathogenicity factors acting at infection of the pathogens with host plants and virulence factors acting at developing lesions. However, there are other cases where it is not possible to distinguish exactly between pathogenicity factors and virulence factors, and most pathotoxins have both functions (Nishimura and Kohmoto, 1983; Rudolph, 1976; Scheffer, 1983).

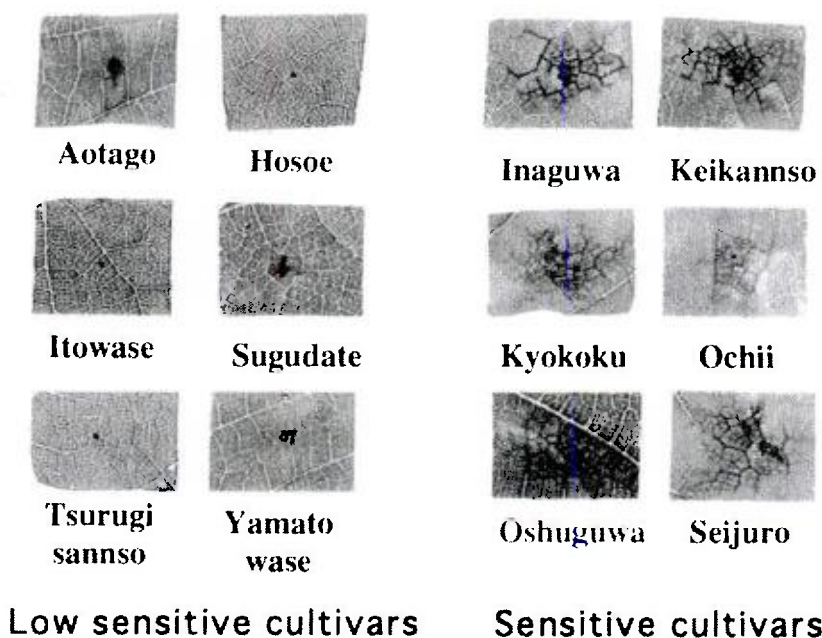


Figure 5. Comparison of sensitivity of resistant mulberry leaf cultivars and susceptible cultivars against *Myrothecium roridum*. The leaves were dropped with 1 ppm concentration of myrotoxin B (four days after the treatment). The small black spot at center of each leaf is ink marking of the part treated with myrotoxin B.

*Figure 5. Comparaison de la sensibilité des cultivars de mûrier résistants et des cultivars sensibles contre *Myrothecium roridum*. On dépose une concentration d'1 ppm de myrotoxine B (quatre jours après le traitement). La petite tache noire au centre de chaque feuille est de l'encre qui marque la partie traitée avec la myrotoxine B.*

Since pathogenicity factors act at infection, the toxins should be produced at the time of germination of the pathogen conidia. In this paper, myrotoxin B may be produced within 20 h after the inoculation (Table I). Moreover, myrotoxin B enhanced the infection of the strain M9403 conidia on mulberry leaves (Fig. 2), and the toxin might play role as a suppressor of pathogenicity of

M. roridum (Fig. 3). These phenomena may be caused by the increase in sensitivity of mulberry leaf cells by exposition of myrotoxin B. HC-toxin produced by *Cochilioborus carbonum* roles as a suppressor in corn leaf cells by inhibition of histone deacetylases (Brosch *et al.*, 1995). Trichothecenes inhibit polypeptide chain elongation in eukaryotic cells (Ehrich and Daigle, 1987). Therefore, myrotoxin B maybe also acts as a suppressor by the inhibition of polypeptide chain elongation in mulberry leaf cells. These results suggest that myrotoxin B acts as an infection factor in the pathogenicity of *M. roridum*.

Since myrotoxin B productivity of *M. roridum* strains related to virulence of the strains (Fig. 4) and sensitivity of mulberry cultivar against myrotoxin B related to sensitivity of them to virulence of the strain M9403 (Fig. 5), myrotoxin B may act as virulence factor in the pathogenicity of *M. roridum*. We have reported preliminary findings on the potential role of mycotoxins produced by *M. roridum* strain M9403 in the pathogenicity of the fungus in following:

1) the mycotoxins enhanced infection of the strain (Murakami *et al.*, 1995); 2) the mycotoxins located in mulberry leaves in advance of M9403 fungal growth from infection parts to healthy parts to suppress resistance of mulberry leaf cells against invasion of the fungus (Murakami and Shirata, 1998a); 3) *M. roridum* strains having weak pathogenicity had less mycotoxin productivity (Murakami and Shirata 1998a; Murakami and Shirata, 1999); 4) myrotoxin B played a role as a primarily pathotoxin in the pathogenicity of the strain (Murakami *et al.*, 2004). These results supported the suggestion that myrotoxin B might act as pathogenicity factor and virulence factor of M9403 and agreed with the results in this paper.

The same is true for roridin E trichothecene produced by *M. roridum* strain ATCC52485 causing leaf spot and fruit rot of muskmelon. Bean *et al.* (1988) revealed that roridin E might be a host-specific virulence factor because roridin E shows more toxic activity in susceptible cultivars caused larger lesions by inoculation with the strain in resistant cultivars caused small lesions. Kuti *et al.* (1989) showed that roridin E might be a pathogenicity factor because the rank of host cultivars with respect to the amount of electrolyte leakage induced in them by roridin E was similar to the rank of cultivars after inoculation with the strain.

These results may contribute in clarifying the mechanisms of phytotoxin produced by phytopathogens in as well as in controlling disease caused by *Myrothecium*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to H. Tamura and K. Miyamoto, National Institute of Biological Sciences for revising the English in this paper.

REFERENCES

- BEAN, G. A., KUTI, J. & NG, T. (1988) Involvement of trichothecenes in the pathogenicity of *Myrothecium roridum*. p. 608-613. In Abstr. Biodeterioration 7: Seventh International Biodeterioration Symposium. Gambridge, England, UK.
- BROSCH, G., RANSOM, R., LECHNER, T., WALTON, J. & LOIDL, P. (1995). Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-specific toxin of *Cochilioborus carbonum*. The Plant Cell 7: 1941-1950.
- EHRIK, K. C. & DAIGLE, K. W. (1987) Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. Biochimica. Biophysica. Acta. 923: 206-213.
- KUTI, J. O., NG, T. J. & BEAN, G. A. (1989). Possible involvement of a pathogen-produced trichothecene metabolite in *Myrothecium* leaf spot of muskmelon. Physiol. Molecular Plant Pathol. 34: 41-53.
- MURAKAMI, R., SHIRATA, A., YOSHIDA, S., SEGAWA, H. & TAKAHASHI, K. (1995). Differences in size of lesions on leaves infected with *Myrothecium roridum* Tode ex Fries in mulberry cultivars. Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci. 12: 31-46.

- MURAKAMI, R. & SHIRATA, A. (1998a). The toxic components produced by *Myrothecium roridum* causal fungus of leaf spot of mulberry and it's influence on the pathogenicity. J. Seric. Sci. Jpn. 67: 57-64.
- MURAKAMI R, SHIRATA A, INOUE A (1998b). A selective medium containing the toxins of *Myrothecium roridum* for isolation from soil. J. Seric. Sci. Jpn. 67: 381-387.
- MURAKAMI, R. & SHIRATA, A. (1998b). Production of the toxic components from *Myrothecium roridum* and its toxicity to various plants. J. Seric. Sci. Jpn. 67: 135-142.
- MURAKAMI, R., YASUI, H., SHIRATA, A. & KATO, A. (1999). Production of myrotoxin B by *Myrothecium roridum* isolated from *Myrothecium* leaf spot of mulberry in Japan. J. Seric. Sci. Jpn. 68: 469-477.
- MURAKAMI, R. & SHIRATA, A. (1999). Mutants of *Myrothecium roridum* with weak pathogenicity induced by irradiation with ultraviolet rays and toxin production ability. J. Seric. Sci. Jpn. 68: 515-519.
- MURAKAMI, R., MIYAMOTO, K., MITSUHASHI, W. & WADA S. (2004) Detection of myrotoxins produced by pathogen in *Myrothecium* leaf spot of mulberry. Sericologia 44: in press.
- NESPIAK, A., KOCOR, M. & SIEWINSKI, A. (1961) Antibiotic properties of mycelium and metabolites of *Myrothecium roridum*. Nature. 192: 138-139.
- NISHIMURA, S. & KOHMOTO, K. (1983) Role of toxins in pathogenesis. In Toxins and Plant Pathogenesis. (Daly, J. M. and Deverall, B. J. eds.) p. 137-157. Academic Press, Sydney.
- RUDOLPH, K. (1976) Non-specific toxins. In Encyclopedia of Plant Pathology. New. Ser. Vol. 4. Physiological Plant Pathology. (Heitefuss, R. and Williams, P. H. eds.) p. 270-315. New York Springer, New York.
- SCHEFFER, R. P. (1983) Toxins as chemical determinations of plant disease. In Toxins and Plant Pathogenesis. (Daly, J. M. and Deverall, B. J. eds.) p. 1-40. Academic Press, Sydney.
- TAKAHASHI, K., SEGAWA, H. & KOBAYASHI, T. (1994). *Myrothecium* leaf spot of mulberry caused by *Myrothecium roridum* Tode: Fries. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 60: 122-127.

ROLES POSSIBLES DE LA MYROTOXINE B PRODUITE PAR LE PATHOGENE DE LA TACHE DE LA FEUILLE *MYROTHECIUM* CHEZ LE MURIER

R. MURAKAMI¹ & A. SHIRATA

1. National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2, Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japon.

La myrotoxine B est une pathotoxine principale produite par *Myrothecium roridum* qui est le pathogène fongique de la tache de la feuille *Myrothecium*. Jusqu'à présent, les rôles de la toxine dans la pathogénicité du champignon ne sont pas clairs, nous avons donc examiné la cinétique de la production de la myrotoxine B par *M. roridum* sur les feuilles de mûrier, l'effet de la toxine sur le taux d'infestation des feuilles de mûrier par le champignon, le rôle de la toxine comme suppresseur de la résistance des feuilles de mûrier à l'invasion par les champignons, la relation entre la production de la toxine chez les souches de *M. roridum* produisant la myrotoxine B et leur virulence et nous avons comparé la sensibilité vis à vis de la toxine des feuilles de mûrier des cultivars sensibles et des cultivars résistants à la maladie. Dans cette étude, la myrotoxine B est produite par *M. roridum* sur les feuilles de mûrier 20 h après l'inoculation. Bien que les conidies du champignon seules n'infestent pas les feuilles de mûrier, cela se produit lorsqu'on les mélange avec 10^{-6} ppm ou plus de myrotoxine B. Des champignons avirulents pour les feuilles de mûrier infestent les feuilles quand on dépose de la myrotoxine B sur les feuilles avant l'inoculation. Les souches de *M. roridum* produisant la myrotoxine B qui présentent une virulence élevée pour les feuilles de mûrier montrent une productivité de toxine élevée et les cultivars de mûrier résistants subissent de plus petites nécroses que les cultivars sensibles même lorsqu'on dépose de la toxine. Les résultats suggèrent que la myrotoxine B joue un rôle en tant que facteur d'infestation et facteur de virulence de *M. roridum*.

INTRODUCTION

La myrotoxine B (Fig. 1), métabolite primaire de la mycotoxine de *Myrothecium roridum* Tode ex Fries qui entraîne la tache de la feuille du mûrier *Morus alba* et *M. bombycis* (Murakami et coll., 1999 ; Takahashi et coll., 1994), appartient aux trichotécènes qui sont chimiquement liés aux époxydes sesquiterpénoides. Cependant, leur fonction dans le champignon qui les produit n'est pas évidente.

Nous avons fait des observations préliminaires sur la détection de la myrotoxine B dans les feuilles de mûrier inoculées avec la souche M9403 de *M. roridum* et sur l'existence de la toxine comme pathotoxine principale dans les feuilles (Murakami et coll., 2004). Cependant, les rôles de la toxine dans la pathogénicité de *M. roridum* n'avaient pas été vérifiés. Dans cette étude, nous avons donc réalisé des expériences *in vitro* pour étudier la fonction de la myrotoxine B dans la pathogénicité de la souche M9403 de *M. roridum* : 1) la cinétique de la production de la myrotoxine B par les conidies sur les feuilles de mûrier en 48 h ; 2) les effets de la toxine sur l'infestation des feuilles de mûrier par les conidies ; 3) le rôle de la toxine comme suppresseur pour les feuilles de mûrier ; 4) la relation entre la productivité de la toxine de *M. roridum* et sa virulence et 5) la mesure des réponses spécifiques à la toxine selon les cultivars de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Préparation des feuilles de mûrier :

Le cultivar de mûrier " Shin ichinose " a été cultivé dans la mûraie du *National Institute of Agrobiological Sciences* (Tsukuba, Japon). On utilise les feuilles du cultivar sauf mention contraire. La mûraie est labourée pour lutter contre les mauvaises herbes et on s'assure que le sol est exempt de *M. roridum*. On récolte les feuilles de mûrier approximativement 30 cm en-dessous du sommet des branches et on les stérilise avec de l'éthanol à 70 %. On perce les feuilles avec un faisceau de 10 aiguilles (partie perforée).

Souche fongique et culture :

On incube la souche M9403 de *M. roridum* isolée à partir de feuilles de mûrier (Murakami et Shirata, 1998a) sur un milieu agar saccharose pomme de terre (PSA : 2 % de saccharose et 1,8 % d'agar dans 20 % de bouillon de pomme de terre) à 25° C pendant deux semaines. Avant l'inoculation conidiale, on recueille les conidies de la culture et on les lave avec de l'eau distillée stérilisée (SDW) trois fois pour éviter la contamination des mycotoxines sécrétées par le champignon (conidies lavées).

Myrotoxine B :

On purifie la myrotoxine B d'après la méthode de Murakami et coll., (1999). On incube la souche M9403 sur du PSA à 25° C pendant un mois et on isole la myrotoxine B du filtrat de culture en utilisant la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC, LC 10A, Shimadzu, Kyoto).

Détection de la myrotoxine B 48 h après l'inoculation de *M. roridum* :

On coupe des morceaux de feuilles de mûrier de 1 × 1 mm, on les trempe dans une suspension conidiale de M9403 (5×10^5 conidies / ml) et on les incube à 25° C pendant 48 h. A des intervalles de deux heures après le traitement, on enlève les feuilles, on les sèche et on les trempe dans 20 ml de méthanol à 90 tpm pendant une heure. On répète cette extraction trois fois. On fait évaporer l'extrait qui en résulte et on le dissout dans 100 µl de méthanol. On réalise la séparation par chromatographie liquide sous haute pression d'extraits de 20 µl avec un système à livraison de solvant avec une colonne ODS-II (4,6 mm × 15 cm, Shimadzu Techno-Research, Kyoto). Puisqu'on élue la myrotoxine B à 20 minutes avec 50 % de méthanol aqueux (vitesse d'élution à 1 ml / min) à 40° C (Murakami et coll., 1999 ; Murakami et coll., 2004), on échantillonne les fractions éluées pour un temps de rétention de 19,8 à 20,3 min. par la même méthode. On fait évaporer la fraction échantillonnée, on la dissout dans 20 µl de méthanol 0,1 % puis on la dépose sur trois parties perforées de feuilles de mûrier pour mesurer les activités toxiques de la myrotoxine B. Comme témoin on dépose 20 µl de méthanol à 0,1 % sur d'autres parties perforées sur les mêmes feuilles et cela n'a pas d'effet sur les feuilles.

Quand on dépose un extrait avec une activité toxique sur la feuille de mûrier, la nécrose se produit. On évalue l'activité d'après le degré de nécrose sur la partie traitée. On mesure les longueurs longitudinale (LL) et verticale (VL) de la nécrose sept jours après le traitement. On répète cette expérience trois fois.

Examen des effets de la myrotoxine B sur le taux d'infestation par les conidies de *M. roridum* :

On dépose la solution de myrotoxine B ($5 \mu\text{l}$, 10^{-8} - 10^{-3} ppm de myrotoxine B dans 0,1 % de méthanol avec une série de 10 ppm et $0,125$ à $1,9 \times 10^{-3}$ ppm par dilution à la fois par étapes) sur 100 parties perforées sur les feuilles de mûrier. Après que la solution ait séché, on dépose 10 µl de suspension conidiale de la souche M9403 (10^6 conidies / ml dans de l'eau distillée stérilisée) sur ces parties. Comme témoin, on dépose 10 µl de 0,1 % de méthanol sur les parties perforées avant d'appliquer la suspension conidiale.

Quand les feuilles sont infestées par le champignon, des hyphes et des sporodochium du champignon se forment sur les lésions des feuilles. On vérifie chaque taux d'infestation du champignon sept jours après l'inoculation. On répète cet examen trois fois.

Mesure de la fonction de la myrotoxine B comme suppresseur sur les feuilles de mûrier :

Puisque la myrotoxine B présente une activité antifongique contre d'autres genres que *Myrothecium* (Murakami et coll., 1998b ; Nespiak et coll., 1961), on recueille les champignons qui tolèrent la toxine et sont avirulents pour les feuilles de mûrier dans la Préfecture de Kyoto, de Fukushima et d'Ibaraki.

Cent feuilles saines sont perforées, chaque feuille en 10 endroits, et on dépose 10 µl de myrotoxine B (5 ppm) sur les parties. On sélectionne les champignons qui apparaissent sur les nécroses comme des champignons tolérant la toxine et on réalise des prélèvements monoconidiaux ou monohyphaux pour chaque champignon.

En deuxième lieu, on incube les champignons sélectionnés sur PSA pendant une semaine et on inocule un morceau hyphal (3 × 3 × 3 mm) de la culture sur les parties perforées des feuilles de mûrier. Dix jours après l'inoculation, on sélectionne les champignons qui ne provoquent pas de lésions sur les feuilles de mûrier comme des champignons avirulents pour les feuilles de mûrier.

Trois inocula des champignons sélectionnés sont déposées sur trois parties perforées sur une feuille de mûrier 1) partie hyphale des champignons, 2) 10 µl de myrotoxine B (0,03 ppm, la concentration de la myrotoxine B ne provoque pas de nécrose sur les feuilles de mûrier), 3) on inocule l'inoculum 1) après avoir déposé l'inoculum 2) après qu'il ait séché. On évalue l'infestation des feuilles de mûrier par le champignon en détectant des lésions et on isole à nouveau les champignons inoculés.

Mesure de la productivité de la myrotoxine B par les souches de *M. roridum* et de leur virulence :

A : Sélection de souches produisant la myrotoxine B :

On incube les souches de *M. roridum* recueillies dans 14 préfectures du Japon sur un milieu agar de feuille de mûrier (MA : 25 g d'agar dans un bouillon de feuilles de mûrier séchées à 15 %) dans une boîte de Petri (4 cm de diam.) à 25° C pendant sept jours. On sèche les cultures et on les agite avec 2 ml de méthanol à 40 tpm pendant une heure. On dépose quarante microlitres des extraits et la myrotoxine B (10 µl, 5 ppm) sur une plaque pour chromatographie sur couche mince (TLC) (DC-Alufolien Kieselgel 60 F254, Merck, Darmstadt). On développe la plaque avec du diéthyl éther et on vaporise les conidies de la souche M 9401 sensible aux mycotoxines produites par *M. roridum* sur la plaque (méthode de titrage biologique par TLC, Murakami et coll., 1998a). On sélectionne les souches produisant un composant toxique ayant la même valeur que celui de la myrotoxine B comme des souches produisant la myrotoxine B ou des composants toxiques similaires.

B : Evaluation de la productivité des souches de *M. roridum* :

On évalue la productivité en mycotoxine de la souche sélectionnée par l'expansion de la nécrose en appliquant un filtrat de culture de chaque souche sur les feuilles de mûrier. On incube les souches sélectionnées sur MA pendant 10 jours. On réalise l'incubation et l'extraction des composants toxiques des cultures dans les mêmes conditions que dans la partie A. On sèche chaque extrait qui en résulte et puis on le dissout avec 2 ml de méthanol à 0,1 %. On dépose la solution (5 µl) sur trois parties perforées sur les feuilles de mûrier. On mesure le LL et le VL de la nécrose sept jours après les traitements et on évalue la productivité en myrotoxine B de chaque souche d'après l'expansion de la nécrose (LL × VL).

C : Mesure de la virulence des souches de *M. roridum* :

On évalue la virulence suite à l'inoculation conidiale des souches sur les feuilles de mûrier d'après le développement de la lésion. On suspend les conidies lavées de chaque souche dans un milieu de bouillon de feuille de mûrier à moitié concentré (1/2-M ; 17,5 % de bouillon de feuilles de mûrier séchées). On dépose 10 µl de suspension de conidies (2×10^6 conidies / ml dans 1/2 milieu-M) sur trois parties perforées sur les feuilles. On mesure le LL et le VL des lésions sept jours après les traitements.

Mesure de la réponse spécifique à la myrotoxine B et à *M. roridum* des cultivars de mûrier :

Pour étudier la sensibilité des cultivars de mûrier à *M. roridum* par le traitement avec la myrotoxine B, on recueille six cultivars résistants (Aotago, Hosoe, Itouwase, Kanzanso, Sudugate, Tsurugisannso et Yamatowase) qui ont de petites lésions et six cultivars sensibles (Inaguwa, Keikanso, Kyoukoku, Ochii, Ousyugawa et Seijuro) qui ont de grandes lésions suite à l'inoculation de la souche M9403 (Murakami et coll., 1995) et on les coupe en morceaux de 3×3 cm. On dépose cinq micro litres de 10 ppm ou 1 ppm de myrotoxine B (dans 0,1 % de méthanol) sur trois parties perforées. On mesure le LL et le VL des nécroses après le traitement.

RESULTATS

Détection de la myrotoxine B sur les feuilles de mûrier inoculées par *M. roridum* :

La couleur des morceaux de feuilles de mûrier change légèrement de vert à vert marron suite à l'inoculation de la souche M9403 et on isole *M. roridum* à partir des morceaux inoculés.

Jusqu'à 18 h il ne se produit aucune nécrose mais il s'en produit 20h après l'inoculation (Tableau I) et le pourcentage d'émergence de la nécrose (PNE) augmente à ce moment (ex. $0,56 \text{ mm}^2$ et PNE = 55,6 % au bout de 24h, $0,89 \text{ mm}^2$ et PNE = 66,7 % après 30h). Le PNE est de 100 % 34 h après l'inoculation. La surface des nécroses dépend de la durée ($p < 0,001$ à l'ANOVA).

Effets de la myrotoxine B sur le taux d'infestation de *M. roridum* :

Quand on inocule comme témoin la suspension conidiale M9403 avec du méthanol à 0,1 % sur les feuilles de mûrier, le taux d'infestation (IR) du champignon est de 0 %. L'IR est de 0 % quand on dépose une suspension conidiale avec 10^{-8} ppm et 10^{-7} ppm de myrotoxine B sur les feuilles de mûrier (Fig. 2). Quand on dépose une suspension conidiale avec 10^{-6} ppm de toxine, *M. roridum* infeste les feuilles de mûrier (IR = 1,7 %). Le taux d'infestation augmente entre 10^{-6} ppm et 0,06 ppm ($p < 0,001$ avec l'analyse de variance). Par exemple, avec 10^{-3} ppm de toxine il est de 10 %, avec $7,8 \times 10^{-3}$ ppm de 55 % et avec 0,03 ppm de 96,7 %. Avec 0,06 ppm et plus de toxine l'IR est de 100 %.

Fonction de la myrotoxine B comme supprimeur :

43, 56 et 63 souches de champignons avirulents tolérant la myrotoxine B ont été recueillies respectivement dans la Préfecture de Fukushima, la Préfecture d'Ibaraki et la Préfecture de Kyoto. Deux, dix et un champignon de chaque endroit entraînent des lésions après le traitement avec la toxine dans les parties inoculées (Fig. 3) et chaque champignon forme des hyphes de chaque souche sur les lésions.

Relation entre la productivité de la myrotoxine B par les souches de *M. roridum* et leur virulence :

La couleur des plaques TLC est blanche et celle des hyphes de M9401 est noire. Donc, la couleur de la zone sur la plaque où les mycotoxines sont présentes est blanche et elle est noire là où elle sont absentes.

D'après les résultats obtenus avec la méthode de titrage biologique par chromatographie sur couche mince, on confirme que les 70 souches isolées produisent de nombreux types de toxines

puisque'on détecte de nombreuses taches présentant une activité antifongique. Pour étudier la relation entre la productivité en mycotoxine et la virulence des souches de *M. roridum*, on mesure la productivité en mycotoxine et la virulence des 70 souches et le coefficient de corrélation est de 0,41.

Sur les 70 souches, on sélectionne 36 souches produisant de la myrotoxine B. Pour étudier la relation entre la productivité en myrotoxine B et la virulence des souches produisant la myrotoxine B, on mesure la productivité en myrotoxine B et la virulence des souches et le coefficient de corrélation est de 0,67 (Fig. 4).

Réponse spécifique des cultivars de mûrier à la myrotoxine B :

Lorsqu'on traite les cultivars sensibles à M9403 avec 10 ppm de myrotoxine B, les nécroses générales sur les parties traitées ont une surface moyenne de 270 mm² et chez les cultivars résistants, la surface moyenne est de 254 mm². Il n'y a pas de différence significative pour la surface de la nécrose entre les cultivars résistants et sensibles.

Cependant, quand on applique 1 ppm de toxine sur les feuilles, les nécroses provoquées par la toxine ont une surface moyenne respectivement de 92 mm² chez les cultivars sensibles et de 22mm² sur les cultivars résistants, (Fig. 5). La surface de la nécrose chez les cultivars sensibles est significativement plus importante que chez les cultivars résistants (Test-t de Student ; p = 0,02).

DISCUSSION

Les pathotoxines des phytopathogènes sont divisées en deux catégories principales en fonction de leur rôle : les facteurs de pathogénicité qui agissent sur l'infestation des plantes hôtes par les pathogènes et les facteurs de virulence qui agissent sur le développement des lésions. Cependant, il y a d'autres cas où il n'est pas possible de faire exactement la distinction entre les facteurs de pathogénicité et les facteurs de virulence et la plupart des pathotoxines ont les deux fonctions (Nishimura et Kohmoto, 1983 ; Rudolph, 1976 ; Scheffer, 1983).

Puisque les facteurs de pathogénicité agissent sur l'infestation, les toxines devraient être produites au moment de la germination des conidies du pathogène. Dans cet article, la myrotoxine B semble être produite 20 h après l'inoculation (Tableau I). De plus, la myrotoxine B augmente l'infestation des conidies de la souche M9403 sur les feuilles de mûrier (Fig. 2) et la toxine pourrait jouer un rôle comme suppresseur de la pathogénicité de *M. roridum* (Fig. 3). Ces phénomènes pourraient être causés par l'augmentation de la sensibilité des cellules de la feuille de mûrier par l'exposition à la myrotoxine B. La toxine HC produite par *Cochlioborus carbonum* agit comme un suppresseur dans les cellules de la feuille de maïs par l'inhibition des histone-déacetylases (Brosch et coll., 1995). Les trichothécènes inhibent l'allongement de la chaîne des polypeptides dans les cellules eukaryotiques (Ehrich et Daigle, 1987). La myrotoxine B agit peut-être aussi comme un suppresseur par l'inhibition de l'allongement de la chaîne des polypeptides dans les cellules foliaires de mûrier. Ces résultats suggèrent que la myrotoxine B agit comme un facteur d'infestation dans la pathogénicité de *M. roridum*.

Puisque la productivité en myrotoxine B est liée à la virulence des souches (Fig. 4) et puisque la sensibilité du cultivar de mûrier à la myrotoxine B est liée à sa sensibilité à la virulence de la souche M9403 (Fig. 5), il se pourrait que la myrotoxine B agisse comme facteur de virulence dans la pathogénicité de *M. roridum*. Nous avons rapporté des observations préliminaires suivantes sur le rôle potentiel des mycotoxines produites par la souche M9403 de *M. roridum* dans la pathogénicité du champignon :

1) les mycotoxines augmentent l'infestation de la souche (Murakami et coll., 1995) ; 2) les mycotoxines situées dans les feuilles de mûrier déplacent la croissance fongique de M9403 des parties infestées aux parties saines pour supprimer la résistance des cellules de la feuille de mûrier à l'invasion par le champignon (Murakami et Shirata, 1998a) ; 3) les souches de *M. roridum* ayant une faible

pathogénicité ont une productivité plus faible en mycotoxine (Murakami et Shirata 1998a ; Murakami et Shirata, 1999) ; 4) la myrotoxine B joue un rôle comme pathotoxine principale dans la pathogénicité de la souche (Murakami et coll., 2004). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la myrotoxine B pourrait agir comme facteur de pathogénicité et facteur de virulence de M9403 et sont en accord avec les résultats de cet article.

La même chose est vraie pour le trichothécène de la roridine E produit par la souche ATCC52485 de *M. roridum* qui entraîne la tache de la feuille et le pourrissement du fruit du melon. Bean et coll., (1988) ont révélé que la roridine E pourrait être un facteur de virulence spécifique à l'hôte parce que la roridine E montre plus d'activité toxique chez les cultivars sensibles chez qui elle entraîne de plus grandes lésions, l'inoculation avec la souche chez les cultivars résistants entraînent de plus petites lésions. Kuti et coll., (1989) ont montré que la roridine E pourrait être un facteur de pathogénicité parce que le classement des cultivars hôtes en fonction de la quantité de fuite d'électrolyte induite par la roridine E est similaire au classement des cultivars après l'inoculation avec la souche.

Ces résultats pourraient contribuer à la clarification des mécanismes de la phytotoxine produite par les phytopathogènes ainsi qu'à lutter contre la maladie provoquée par *Myrothecium*.

BOTANICALS FOR THE MANAGEMENT OF BACTERIAL FLACHERIE OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

S. MANIMEGALAI & N. CHANDRAMOHAN

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

In vitro and *in vivo* studies conducted for the identification of effective botanicals for the management of bacterial flacherie of silkworm, *Bombyx mori* L., revealed that the botanical, *Thuja orientalis* L. exhibited its effectiveness under "*in vitro*" conditions by inhibiting the growth of *Bacillus thuringiensis* at a dose of 10,000 ppm. *Curcuma domestica* V. showed partial effectiveness at 40,000 ppm. Under "*in vivo*" conditions, *T. orientalis* at 10,000 ppm was the most effective reducing the mortality caused by 01-TAD-01 and 01-CHI-01 strains of *B. thuringiensis* to 30.03 per cent and 36.00 per cent respectively as against 73.74 and 76.00 percent mortality in the treated control. Administration of botanicals also resulted in improvement of the economic parameters.

Keywords: *Bombyx mori* L., bacterial flacherie, botanicals, *Thuja orientalis* L., *Curcuma domestica* V., mortality, economic characters.

INTRODUCTION

The plant products are gaining prominence as bactericides due to their eco friendly nature. The acetate and ether extracts of *Thuja occidentalis* and alcohol and ether extracts of *Pinus banksiana* Lambert and *Picea mariana* (Miller) showed complete inhibition of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Smirnof and Hutchison, 1965). Maksymuk (1970) found the presence of antibacterial substances that inhibit the growth of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* in leaves of 22 plants belonging to six orders i. e., pinaceae, taxaceae, fagaceae, salicaceae, hamamelidaceae and leguminosae. The antibacterial effect of essential oil from rhizomes of *Curcuma caesia* (Roxb.) rich in curcumene, ionone and turmeron was demonstrated by Garg and Jain (1998). Complete inhibition of nine strains of *Staphylococcus aureus* at a concentration of 6.5 mg/ml of the leaf extract of Goiaba, *Coccus aureus* by different methods such as plate count, disc inhibition zone and turbidity technique was demonstrated by Gnan and Demello (1999). Selvakumar *et al.* (2001) reported the efficacy of seven plant products against the bacteria sp. isolated from diseased *B. mori*, i. e., *Streptococcus* and *Staphylococcus* sp. which caused a mortality of 38.00 per cent and 30.00 per cent in third instar larvae of CSR2 × CSR 4 when inoculated at a dose of 10^7 cells/ml of sterile distilled water.

MATERIALS AND METHODS

In vitro and *in vivo* studies were conducted for the identification of botanicals for bacterial flacherie management at the Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. Two *B. thuringiensis* strains were isolated from flacherised cadavers (Govindan *et al.*, 1998) and named as 01-TAD-01 and 01-CHI-01. The cultures of these *B. thuringiensis* strains were maintained in the laboratory on T3 medium (Travers *et al.*, 1987). The *B. thuringiensis* strains, 01-TAD-01 and 01-CHI-01 were identified as H4 and H3 serotype of *B. thuringiensis* respectively by Pasteur Institute, France.

The silkworm larvae of PM × NB₄D₂ were reared in the laboratory on Kanva 2 mulberry leaves as per the method by Krishnaswami *et al.* (1973).

***In vitro* effect of botanicals:**

The aqueous extract of the following plants i. e., leaf extracts of *Plectranthus amboinicus* (Lour), *Thuja orientalis* (L.) and *Psoralea corylifolia* (L.), seed extract of *Medicago sativa* (L.), rhizome extracts of *Curcuma domestica* (V.) and *Zingiber officinale* (Rosc.) and rhizome powder of *Acorus calamus* (L.) were prepared. The plant parts either leaves or rhizome were weighed, thoroughly washed, ground in a pestle and mortar using sterile distilled water. The suspension was filtered using sterile muslin cloth and centrifuged at 5000 rpm for 10 min and the supernatant solution was used for the “*in vitro*” and “*in vivo*” studies. Initially, a concentration of 100,000 ppm was prepared by adding 100 g of the leaves or rhizomes to one litre of sterile distilled water. This was maintained as stock solution from which different concentrations were prepared by serial dilution technique. The aqueous extracts of the botanicals were mixed in T3 agar medium to get the required concentrations of 1000, 5000, 10000, 20000, 40000 and 50000 ppm and poured to the sterile petriplates. After solidification, a loop full of the inoculum was taken from 24 hour old culture of *B. thuringiensis* and streaked on the medium containing the required concentration of the botanicals. The plates were kept for incubation and observed for the growth of *B. thuringiensis* at 24, 48 and 72 hours after inoculation.

***In vivo* effect of *T. orientalis* on flacherie:**

The promising botanical, *T. orientalis* identified from the results of “*in vitro*” studies was used for “*in vivo*” studies. The treatment consisted of *T. orientalis* alone and *B. thuringiensis* combined with *T. orientalis* at various concentrations i. e., 5000, 10,000, 15,000 and 20,000 ppm along with treated and untreated control. The treatments were replicated thrice with 25 larvae / replication. Mulberry leaves were dipped in aqueous extract of *T. orientalis*, shade dried and were then given as first feed after second moult. The spores of *B. thuringiensis* were extracted at 36 and 30 hrs after incubation respectively for 01-TAD-01 and 01-CHI-01 in sterile distilled water and the concentration of spores /ml in stock solution was determined using haemocytometer. (Cantwell, 1974). The stock solution was serially diluted in sterile distilled water to obtain a dose of 1×10^7 spores/ml. Then the mulberry leaves smeared with these suspension were fed to the worms four hrs after treatment of botanicals. Third feeding was also provided with *T. orientalis* treated leaves. Administration of botanicals was also done immediately after third moult. Observations of mortality were recorded until pupation. Economic parameters were also recorded.

RESULTS AND DISCUSSION

***In vitro* efficacy of *T. orientalis*:**

Among the eight plant species evaluated against *B. thuringiensis*, leaf extract of *Thuja orientalis* (L.) showed complete inhibition of both the isolates by streak plate method at concentrations of 10,000, 20,000, 30,000, 40,000 and 50,000 ppm (Table I). Rhizome extract of *Acorus calamus* (L.) showed partial inhibition at 40,000 and 50,000 ppm towards the strain, 01-TAD-01 but it was found to be ineffective against 01-CHI-01 at the same dose.

***In vivo* efficacy of *T. orientalis*:**

The per cent mortality was the least in *B. thuringiensis* + *T. orientalis*, 15,000 ppm (28.93%) however, it did not significantly differ with *B. thuringiensis* + *T. orientalis* 10,000 ppm (30.03%) in case of 01-TAD-01 isolate (Table II).

Table I. Effect of aqueous extract of botanicals on the *in vitro* growth of *B. thuringiensis* (01-TAD-01 and 01-CHI-01).Tableau I. Effet de l'extrait aqueux de substances botaniques sur la croissance *in vitro* de *B. thuringiensis* (01-TAD-01 et 01-CHI-01).

Botanicals <i>Substances botaniques</i>	Growth of <i>B.thuringiensis</i> * at different concentrations of botanicals (ppm) <i>Croissance de B. thuringiensis *avec différentes concentrations de substances botaniques (ppm)</i>												
	1000		5000		10000		20000		30000		40000		50000
	TAD	CHI	TAD	CHI	TAD	CHI	TAD	CHI	TAD	CHI	TAD	CHI	TAD
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) (leaf / feuille)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Medicago sativa</i> (L.) (seed / graine)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acorus calamus</i> (L.) (rhizome)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±
<i>Zingiber officinale</i> (Rosc.) (rhizome)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Curcuma domestica</i> (V.) (rhizome)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-
<i>Pinus patula</i> (L.) (leaf / feuille)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Thuja orientalis</i> (L.) (leaf / feuille)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psoralea corylifolia</i> (L.) (leaf / feuille)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Streak plate method / *Méthode par stries sur plaque.* - Inhibition. ± Partial inhibition / *Inhibition partielle.* + No inhibition / *Pas d'inhibition.*

Table II. *In vivo* efficacy of *T. orientalis* against *B. mori* flacherie.Tableau II. Efficacité *in vivo* de *T. orientalis* contre la flacherie de *B. mori*.

Treatments	<i>B. thuringiensis</i> isolates Isolats de <i>B. thuringiensis</i>	
	01-TAD-01 Mortality (%)	01-CHI-01 Mortality (%)
Traitements	(%) de mortalité	(%) de mortalité
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 5000 ppm	65.13 ± 4.45 (53.83) ^d	71.33 ± 1.15 (57.63) ^d
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 10000 ppm	30.03 ± 4.25 (33.13) ^{bc}	36.00 (4.00) (36.85) ^b
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 15000 ppm	28.93 ± 5.44 (32.47) ^b	33.33 ± 4.11 (35.21) ^b
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 20000 ppm	40.20 ± 4.52 (39.33) ^c	48.00 ± 4.92 (43.84) ^c
<i>T. orientalis</i> alone / <i>T. orientalis</i> seul 5000 ppm	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00
<i>T. orientalis</i> alone / <i>T. orientalis</i> seul 10000 ppm	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00
<i>T. orientalis</i> alone / <i>T. orientalis</i> seul 15000 ppm	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00
<i>T. orientalis</i> alone / <i>T. orientalis</i> seul 20000 ppm	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00
Treated control / Témoin traité	73.74 ± 5.83 (59.32) ^d	76.00 ± 4.00 (60.72) ^d
Untreated control / Témoin non traité	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00

Data presented in the table are mean and S.D values (±) / Les données présentées dans le tableau sont la moyenne et les valeurs pour les écarts types.

In a column, means followed by common letter(s) are not significantly different by DMRT ($P = 0.05$) / Dans une colonne, les moyennes suivies par une ou plusieurs lettres communes ne sont pas significativement différentes par DMRT ($P = 0.05$)

Figures in parentheses are arc sin transformed values / Les figures entre parenthèses sont les valeurs arc sin transformées.

Similar result was obtained with 01-CHI-01 wherein *B. thuringiensis* + *T. orientalis* 15,000 ppm recorded 33.33 per cent mortality which was not significantly different from *B. thuringiensis* + *T. orientalis* 10,000 ppm (36.00%) (Table II).

The higher mortality for 20,000 ppm may be due to the repellent effect of *T. orientalis* at higher concentrations.

The efficacy of *T. occidentalis* against *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* were reported earlier by Smirnoff and Hutchison (1965) and Chadha (1976) who reported the efficacy of the same against gram positive organisms. *Thuja orientalis* (L.) at 10,000 ppm was effective against both the isolates under *in vitro* condition. *Curcuma domestica* (V.) was found to show complete inhibition at 50,000 ppm and partial inhibition at 40,000 ppm. The disease control efficacy may be attributed to the presence of antibacterial substances in leaves of these plants which might have imparted resistance to disease. Kushner and Harvey (1962) reported that the antibacterial substances in plant leaves inhibited the formation of crystals.

Table III. *In vivo* effect of aqueous extract of *T. orientalis* on the economic characters of *B. mori* exposed to *B. thuringiensis* (01-TAD-01).

Tableau III. Effet *in vivo* de l'extrait aqueux de *T. orientalis* sur les caractères économiques de *B. mori* exposé à *B. thuringiensis* (01-TAD-01).

Treatments	Larval weight (g)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)	Silk filament length (m)
Traitements	Poids larvaire (g)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament de soie (m)
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 5000 ppm	2.96 ^{ab} (± 0.13)	1.59 ^{bcd} (± 0.08)	0.23 ^b (± 0.02)	14.46 ^b (± 0.38)	680 ^c (± 3.00)
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 10000 ppm	3.19 ^{ab} (± 0.16)	1.65 ^{ab} (± 0.04)	0.28 ^a (± 0.02)	16.56 ^a (± 0.56)	736 ^b (± 3.21)
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 15000 ppm	3.12 ^{ab} (± 0.03)	1.68 ^{ab} (± 0.05)	0.28 ^a (± 0.01)	16.67 ^a (± 0.39)	734 ^b (± 2.65)
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 20000 ppm	2.86 ^b (± 0.12)	1.54 ^{cd} (± 0.05)	0.23 ^b (± 0.01)	14.94 ^b (± 0.46)	690 ^c (± 4.00)
<i>T. orientalis</i> alone 5000 ppm	3.19 ^{ab} (± 0.08)	1.70 ^a (± 0.05)	0.28 ^a (± 0.02)	16.65 ^a (± 0.51)	750 ^a (± 2.00)
<i>T. orientalis</i> alone 10,000 ppm	3.46 ^a (± 0.17)	1.72 ^a (± 0.02)	0.29 ^a (± 0.01)	16.67 ^a (± 0.51)	750 ^a (± 4.35)
<i>T. orientalis</i> alone 15,000 ppm	3.16 ^{ab} (± 0.14)	1.64 ^{abc} (± 0.07)	0.27 ^a (± 0.01)	16.46 ^a (± 0.10)	749 ^a (± 3.46)
<i>T. orientalis</i> alone 20,000 ppm	2.95 ^{ab} (± 0.13)	1.52 ^d (± 0.07)	0.27 ^a (± 0.03)	15.13 ^b (± 0.09)	738 ^b (± 2.64)
Treated control / Témoin traité	2.26 ^c (± 0.06)	1.42 ^c (± 0.03)	0.19 ^c (± 0.01)	13.38 ^c (± 0.29)	632 ^d (± 3.00)
Untreated control / Témoin non traité	3.02 ^{ab} (± 0.09)	1.61 ^{abcd} (± 0.03)	0.27 ^a (± 0.01)	17.15 ^a (± 0.15)	745 ^{ab} (± 2.64)

In a column, means followed by common letter (s) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test ($P = 0.05$) / Dans une colonne, les moyennes suivies par une lettre commune ne sont pas significativement différentes d'après le test de Duncan ($P = 0.05$).

Values in parentheses are standard deviation (±) / Les valeurs entre parenthèses sont les écarts type (±).

Table IV. *In vivo* effect of aqueous extract of *T. orientalis* on the economic characters of *B. mori* exposed to *B. thuringiensis* (01-CHI-01).

Tableau IV. Effet *in vivo* de l'extrait aqueux de *T. orientalis* sur les caractères économiques de *B. mori* exposé à *B. thuringiensis* (01 - CHI - 01).

Treatments	Larval weight (g)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)	Silk filament length (m)
Traitements	Poids larvaire (g)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament de soie (m)
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 5000 ppm	3.20 ^{abc} (± 0.04)	1.57 ^{cd} (± 0.04)	0.24 ^d (± 0.02)	15.31 ^{def} (± 0.43)	672 ^c (± 2.52)
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 10000 ppm	3.21 ^{abc} (± 0.02)	1.63 ^{abc} (± 0.03)	0.26 ^c (± 0.01)	15.92 ^{cde} (± 0.45)	712 ^b (± 2.64)
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 15000 ppm	3.10 ^{bcd} (± 0.11)	1.64 ^{ab} (± 0.05)	0.26 ^c (± 0.01)	16.07 ^{bcd} (± 0.43)	718 ^{ab} (± 2.64)
<i>B. thuringiensis</i> + <i>T. orientalis</i> 20000 ppm	2.82 ^c (± 0.14)	1.50 ^{de} (± 0.04)	0.23 ^{de} (± 0.01)	15.11 ^{cf} (± 0.21)	679 ^c (± 4.00)
<i>T. orientalis</i> alone / seul 5000 ppm	3.15 ^{abc} (± 0.15)	1.67 ^{ab} (± 0.04)	0.28 ^{ab} (± 0.02)	16.92 ^{ab} (± 0.54)	729 ^{ab} (± 2.65)
<i>T. orientalis</i> alone / seul 10,000 ppm	3.32 ^a (± 0.05)	1.69 ^a (± 0.04)	0.29 ^a (± 0.01)	17.16 ^a (± 0.24)	730 ^{ab} (± 2.65)
<i>T. orientalis</i> alone / seul 15,000 ppm	3.29 ^{ab} (± 0.02)	1.61 ^{bc} (± 0.04)	0.26 ^c (± 0.01)	16.39 ^{abc} (± 0.26)	720 ^{ab} (± 2.65)
<i>T. orientalis</i> alone / seul 20,000 ppm	2.94 ^{dc} (± 0.13)	1.46 ^e (± 0.04)	0.21 ^e (± 0.01)	14.61 ^f (± 0.37)	712 ^b (± 4.00)
Treated control / Témoin traité	2.48 ^f (± 0.04)	1.37 ^f (± 0.03)	0.18 ^f (± 0.01)	13.13 ^g (± 0.49)	609 ^d (± 2.00)
Untreated control / Témoin non traité	3.09 ^{cd} (± 0.05)	1.65 ^{ab} (± 0.04)	0.27 ^{bc} (± 0.01)	16.36 ^{abc} (± 0.27)	740 ^a (± 3.00)

In a column, means followed by common letter (s) are not significantly different by Duncan's Multiple Range Test ($P = 0.05$) ; Dans une colonne, les moyennes suivies par une ou plusieurs lettres communes ne sont pas significativement différentes d'après le Test de Duncan ($P = 0,05$).
Values in parentheses are standard deviation ($\pm$) / Les valeurs entre parenthèses sont les écarts type ($\pm$).

Kumeswara Rao (2000) reported that the plant extracts agglutinated the pathogenic bacteria. The stem and leaves of *T. orientalis* are reported to be a good source of tannin and flavanoids (Chadha, 1976). The higher tannin content may be the reason for the efficacy of *T. orientalis* against *B. thuringiensis* isolates. This was supported by Pell *et al.* (2000) who reported that tannin cause aggregation of bacterial cells. They act on either the cell wall or cell membrane or on the extracellular elements such as cell secreted enzymes.

The administration of antibiotics also registered higher larval and cocoon parameters excepting at higher concentrations. *B. thuringiensis* combined with *T. orientalis* at 10,000 ppm was found to be highly effective showing higher larval weight (3.46 g), cocoon weight (1.72 g), shell weight (0.29g.), shell ratio (16.67%) and silk filament length (750m.). Use of higher dose of *T. orientalis* i. e., 20,000 ppm exerted a negative influence and recorded lesser values of larval weight (2.95 g), cocoon weight (1.52 g), shell weight (0.27 g), shell ratio (15.13%) and silk filament length (738 m) against the isolate 01-TAD-01 and 2.94 g, 1.46 g, 0.21 g, 14.61 per cent and 712 m respectively against isolate 01-CHI-01 for all the economic parameters excepting cocoon weight in case of 01-TAD-01 and shell ratio in case of 01-CHI-01 (Tables III, IV). The increase in larval weight and cocoon parameters due to administration of plant products were demonstrated by Rajashekhar Gouda (1991) for *Psoralea corylifolia* L. and *Tribulus terrestris* L., *Lantana camara* L. and *Clerodendron inermis* G. (Mamadapur, 1994), *Parthenium hysterophorus* L. and *Tridax procumbens* L. (Mahesha *et al.*, 1999).

REFERENCES

- CHADHA Y. R. (1976) The Wealth of India. Raw material Vol. X: Sp. W. Publications and Information Directorate, CSIR, New Delhi. pp.231-233.
- CANTWELL G. E. (1974) Insect Diseases. Vol II, Marcel Dekkar Inc. New York. pp.501-547.
- GARG S.C. & JAIN R. K. (1998) Antimicrobial efficacy of essential oil from *Curcuma caesia*. Indian J. Microbiol., 38: 169-170.
- GNAN S.O. & DEMELLO M. T. (1999) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. J. of Ethnopharm., 68: 103-108.
- GOVINDAN R., NARAYANASWAMY T.K., DEVAIAH. M.C. (1998) Principles of Silkworm Pathology. Seri. Scientific Publishers, Bangalore, 420 p.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M. N., SURYANARAYANA S. K., KUMARARAJ S. (1973). Silkworm rearing. Sericultural manual 2, FAO Agricultural Services Bulletin. Rome. 131 p.
- KUMESWARA RAO C. (2000) Plants with antibacterial property. In: Material for the database of medicinal plants. Karnataka State Council for Science and Technology. pp. 200-227.
- KUSHNER, D. & HARVEY G.T. (1962) Antibacterial substances in leaves : Their possible role in insect resistance to disease. J. Insect Pathol., 4: 155-184.
- MAHESHA H.M., RAJASHEKHARGOUDA R., AYAR S.G. (1999) Extrafoliation of aqueous extract of botanicals on larval, cocoon and egg parameters of *Bombyx mori* L. Proc. of Natl. Sem. Trop. Seric., pp. 111-114.
- MAKSYMUK B. (1970) Occurrence and nature of antibacterial substances in plants affecting *Bacillus thuringiensis* and other entomogenous bacteria. J. Invertebr. Pathol., 15: 356-371.
- MAMADAPUR B.B. (1994) Botanicals with IGR activity on *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). M.Sc. (Agri.). Thesis, University of Agricultural Sciences, Dharwad, 137 p.
- PELL A.N., WOOLSTON T.K., NELSON K.E., SCHOFIELD P. (2000) Tannins: Biological activity and bacterial tolerance, Dept. of Animal Science, Cornell University, U.S.A. Paper from Internet.
- RAJASHEKHAR GOUDA R. (1991). Studies on methods to increase silk yield of *Bombyx mori* L. Ph.D. Thesis, Tamil Nadu Agric. Univ., Coimbatore, India. 242 p.
- SELVAKUMAR T., BALAVENKATASUBBIAH M., NATARAJU B. (2001) Studies on prevention or suppression of flacherie in silkworm, *Bombyx mori*. Annual Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. pp. 45 .

- SMIRNOFF W.A. AND HUTCHISON P.M.(1965) Bacteriostatic and bacteriocidal effects of extracts of foliage from various plant species on *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. J. Invertebr. Pathol., 7: 273-280.
- TRAVERS R.S., MARTIN P A., REICHELDERFER C.F.(1987) Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol., 1263-1266.

SUBSTANCES BOTANIQUES POUR LUTTER CONTRE LA FLACHERIE BACTERIENNE DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

S. MANIMEGALAI & N. CHANDRAMOHAN

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

Les études *in vitro* et *in vivo* réalisées pour l'identification de substances botaniques efficaces contre la flacherie du ver à soie *Bombyx mori* L. révèlent que la substance de *Thuja orientalis* L. est efficace dans des conditions *in vitro* à une dose de 10 000 ppm pour inhiber la croissance de *Bacillus thuringiensis*. *Curcuma domestica* V. est partiellement efficace à 40 000 ppm. Dans des conditions *in vivo*, *T. orientalis* à 10 000 ppm est plus efficace pour diminuer la mortalité provoquée par les souches 01-TAD-01 et 01-CHI-01 de *B. thuringiensis* avec respectivement 30,03 % et 36 % contre une mortalité de 73,74 et 76 % chez le témoin traité. L'administration de substances botaniques entraîne aussi l'amélioration des paramètres économiques

INTRODUCTION

Les produits à base de plantes prennent de plus en plus d'importance par rapport aux bactéricides parce qu'ils ne nuisent pas à l'environnement. Les extraits acétate et éther de *Thuja occidentalis* et les extraits alcooliques et éther de *Pinus banksiana* Lambert et de *Piceae mariana* (Miller) entraînent une inhibition complète de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Smirnov et Hutchison, 1965). Maksymuk (1970) a trouvé la présence de substances antibactériennes dans les feuilles de 22 plantes appartenant à six ordres, c'est à dire les pinaceae, les taxaceae, les fagaceae, les salicaceae, les hamamelidaceae et les légumineuses qui inhibent la croissance de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Garg et Jain (1998) ont montré l'effet antibactérien de l'huile essentielle des rhizomes de *Curcuma caesia* (Roxb.) riche en curcumène, en ionone et en turmérone. Gnan et Demello (1999) ont montré l'inhibition complète de neuf souches de *Staphylococcus aureus* avec une concentration de 6,5 mg / ml d'extrait de feuille de Goiaba, *Coccus aureus*, avec différentes méthodes telles que le compte des plaques, la zone d'inhibition du disque et la technique de turbidité. Selvakumar et coll., (2001) ont rapporté l'efficacité de sept produits à base de plantes contre des bactéries isolées de *B. mori* malades c'est à dire, *Streptococcus* et *Staphylococcus* sp. qui entraînent une mortalité de 38 % et 30 % chez les larves du 3^{ème} âge de CSR2 × CSR4 quand on les inocule à une dose de 10⁷ cellules / ml d'eau distillée stérile.

MATERIELS ET METHODES

On réalise des études *in vitro* et *in vivo* pour identifier les substances botaniques permettant de lutter contre la flacherie au Département de Sériciculture de l'Université Agricole du Tamil Nadu à Coimbatore. Deux souches de *B. thuringiensis* ont été isolées à partir de cadavres " flachés " (Govindan et coll., 1998) appelées 01-TAD-01 et 01-CHI-01. On maintient les cultures de ces souches de *B. thuringiensis* en laboratoire sur un milieu T3 (Travers et coll., 1987). Les souches de

B. thuringiensis, 01-TAD-01 et 01-CHI-01 ont été identifiées respectivement en tant que sérotype H4 et H3 par l'Institut Pasteur en France.

On élève les larves du ver à soie PM × NB4D2 en laboratoire sur des feuilles de mûrier Kanva 2 d'après la méthode de Krishnaswami et coll. (1973).

Effet *in vitro* des substances botaniques :

On prépare des extraits aqueux des plantes suivantes c'est à dire des extraits foliaires de *Plectanthus amboinicus* (Lour), *Thuja orientalis* (L.) et de *Psoralea corylifolia* (L.), l'extrait de la graine de *Medicago sativa* (L.), des extraits du rhizome de *Curcuma domestica* (V.) et de *Zingiber officinale* (Rosc.) et de la poudre de rhizome d'*Acorus calamus*. On pèse les parties des plantes, soit les feuilles ou le rhizome, on lave soigneusement les feuilles, et on les broie avec un pilon et un mortier en utilisant de l'eau distillée stérile. On filtre la suspension à travers un tissu de mousseline stérile et on la centrifuge à 5000 tpm pendant 10 minutes puis on utilise la solution surnageante pour les études "*in vitro*" et "*in vivo*". Au départ, on prépare une solution à une concentration à 100 000 ppm en ajoutant 100 g de feuilles ou de rhizomes à un litre d'eau distillée stérile. On la maintient comme solution mère à partir de laquelle on prépare différentes concentrations avec la technique de dilutions successives. On mélange les extraits aqueux des produits botaniques dans un milieu agar T3 pour obtenir les concentrations nécessaires de 1 000, 5 000, 10 000, 20 000, 40 000 et 50 000 ppm et on les coule dans des boîtes de petri stériles. Après la solidification, on prend un inoculum sur une culture de *B. thuringiensis* de 24 h et on la strie sur le milieu contenant la concentration nécessaire des substances botaniques. On incube des boîtes de Petri et on observe la croissance de *B. thuringiensis* 24, 48 et 72 heures après l'inoculation.

Effet *in vivo* de *T. orientalis* sur la flacherie :

On utilise la substance botanique de *T. orientalis* prometteuse d'après les résultats d'études "*in vitro*", pour des études "*in vivo*". Le traitement est constitué de *T. orientalis* seul et de *B. thuringiensis* combiné avec *T. orientalis* à des concentrations variées c'est à dire 5 000, 10 000, 15 000 et 20 000 ppm avec également des témoins traités et non traités. On répète les traitements trois fois avec 25 larves / répétition. On plonge les feuilles de mûrier dans l'extrait aqueux de *T. orientalis*, on les sèche à l'ombre et on les donne en premier repas après la deuxième mue. On extrait les spores de *B. thuringiensis* 36 et 30 heures après l'incubation pour 01-TAD-01 et 01-CHI-01 respectivement dans de l'eau distillée stérile et on détermine la concentration des spores dans la solution mère en utilisant un hémoctomètre (Cantwell, 1974). On procède à des dilutions successives de la solution mère dans de l'eau distillée pour obtenir une dose de 1×10^7 spores / ml. Puis on donne les feuilles de mûrier enduites avec cette suspension aux larves quatre heures après le traitement avec les substances botaniques. On procède au troisième repas avec des feuilles traitées avec *T. orientalis*. On procède aussi à l'administration des substances botaniques immédiatement après la troisième mue. On enregistre la mortalité jusqu'à la nymphose. On enregistre aussi les paramètres économiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

Efficacité de *T. orientalis* *in vitro* :

Parmi les huit espèces de plantes évaluées contre *B. thuringiensis*, l'extrait de feuille de *Thuja orientalis* (L.) donne une inhibition complète des deux isolats mesurée par la méthode des plaques par stries à des concentrations de 10 000, 20 000, 30 000, 40 000 et 50 000 ppm (Tableau I). L'extrait de rhizome d'*Acorus calamus* (L.) donne une inhibition partielle à 40 000 et 50 000 ppm envers la souche 01-TAD-01 mais il n'est pas efficace contre 01-CHI-01 à la même dose.

Efficacité *in vivo* de *T. orientalis* :

Le pourcentage de mortalité est le moins important avec le traitement *B. thuringiensis* + *T. orientalis*, à 15 000 ppm (29,93 %), cependant, il ne diffère pas significativement avec *B. thuringiensis* + *T. orientalis* à 10 000 ppm (30,03 %) avec l'isolat 01-TAD-01 (Tableau II).

On obtient un résultat similaire pour 01-CHI-01 chez lequel *B. thuringiensis* + *T. orientalis* à 15 000 ppm donne 33,33 pourcent de mortalité, ce qui n'est pas significativement différent de *B. thuringiensis* + *T. orientalis* à 10 000 ppm (36 %) (Tableau II).

La mortalité plus élevée pour 20 000 ppm pourrait être due à l'effet repoussant de *T. orientalis* à des concentrations plus élevées.

L'efficacité de *T. occidentalis* contre *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* a déjà été rapportée par Smirnoff et Hutchison (1965) et Chadha (1976) qui ont rapporté son efficacité contre les organismes gram positifs. *Thuja orientalis* (L.) à 10 000 ppm est efficace contre les deux isolats dans des conditions *in vitro*. On constate que *Curcuma domestica* (V.) donne une inhibition complète à 50 000 ppm et une inhibition partielle à 40 000 ppm. L'efficacité dans la lutte contre la maladie pourrait être attribuée à la présence de substances antibactériennes dans les feuilles de ces plantes. Kushner et Harvey (1962) ont rapporté que les substances antibactériennes dans les feuilles des plantes inhibent la formation de cristaux.

Kumeswara Rao (2000) a rapporté que les extraits de plante agglutinent les bactéries pathogènes. On rapporte que la tige et les feuilles de *T. orientalis* sont une bonne source de tannin et de flavanoides (Chadha, 1976). La teneur plus élevée en tannin pourrait être la raison de l'efficacité de *T. orientalis* contre les isolats de *B. thuringiensis*. Les études de Pell et coll., (2000) dans lesquelles ils ont montré que les tannins entraînent l'aggrégation des cellules bactériennes confirment cela. Ils agissent soit sur la paroi cellulaire soit sur la membrane cellulaire ou sur les éléments extracellulaires tels que les enzymes sécrétées par la cellule.

L'administration d'antibiotiques donne aussi de meilleurs paramètres chez la larve et le cocon sauf à des concentrations plus élevées. On constate que le traitement *B. thuringiensis* associé à *T. orientalis* à 10 000 ppm est très efficace et donne le poids larvaire (3,46 g), le poids du cocon (1,72 g), le poids de la coque (0,29 g), la richesse soyeuse (16,67 %) et la longueur du filament de soie (750 m) les plus élevés. L'utilisation d'une dose plus élevée de *T. orientalis* c'est à dire de 20 000 ppm a une influence négative et entraîne des valeurs inférieures pour le poids larvaire (2,95 g), le poids du cocon (1,52 g), le poids de la coque (0,27 g), la richesse soyeuse (15,13 %) et la longueur du filament de soie (738 m) contre l'isolat 01-TAD-01 et respectivement de 2,94 g ; 1,46 g ; 0,21 g ; 14,61 pourcent et 712 m contre l'isolat 01-CHI-01 pour tous les paramètres économiques sauf pour le poids du cocon dans le cas de 01-TAD-01 et de la richesse soyeuse dans le cas de 01-CHI-01 (Tableaux III, IV). Rajashekar Gouda (1991) a démontré l'augmentation du poids larvaire et des paramètres du cocon grâce à l'administration de produits à base de plantes comme *Psoralea corylifolia* L., *Tribulus terrestris* L., *Lantana camara* L. et de *Clerodendron inermis* G. (Mamadapur, 1994), *Parthenium hysterophorus* L. et *Tridax procumbens* L. (Mahesha et coll., 1999).

STUDIES ON PRETREATMENT OF BIVOLTINE COCOONS: INFLUENCE OF VACUUM PERMEATION TREATMENTS BEFORE COOKING ON WATER ABSORPTION AND REELING PERFORMANCE OF LONG STORED BIVOLTINE COCOONS

G. HARIRAJ, SUBHAS V. NAIK, K. N. MAHESH, SANGAPPA N. SHILLIN &
T. H. SOMASHEKAR

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

The process of hot air drying removes entire moisture from the cocoon shell. When these cocoons are stored for long periods reeling characteristics are affected. Studies conducted at CSTRl have revealed that by vacuum permeating these cocoons, before cooking, facilitates proper permeation of water molecules into the cocoon shell layers leading to uniform cooking thereby improving the reelability of the cocoons as well as reeling performance of the cocoons. Studies have indicated that both vacuum permeation and number of cycles of permeation have significant effect on the water absorption and reeling performance of the cocoons. The bivoltine cocoons pre-treated at 300mm/Hg, 120 seconds for 2 cycles using vacuum permeation chamber yielded better results. The pre-treatment process is found to soften the sericin by wetting the shell layers uniformly thereby improving the water absorption and reeling characteristics i. e., reelability percentage, raw silk percentage, raw silk recovery percentage and reducing the waste percentage on silk weight. The studies have clearly brought out that a significant improvement in reeling performance of the long stored cocoons is possible by vacuum permeating the bivoltine cocoons prior to cooking, followed by cooking and reeling.

Keywords: Bivoltine cocoons, Vacuum permeation, Vacuum pressure, Vacuum duration, Number of cycles, water absorption and Reelability

INTRODUCTION

The mechanism of cocoon cooking is divided into four sections i. e., pre-treatment before cooking, pre-treatment for cooking, cooking treatment and adjustment treatment [Kinoshita (1997)]. Water permeated inside the cocoon shell during the pre-treatment process is related to the water permeation in the cooking process [Shimazaki and Yamamoto (1962)]. Koike and Murayama (1953, 1954) and Koike (1963a, 1963b, and 1963c) inferred that moisture content in the cocoon shell is related to the cooking temperature. These researchers have also studied the pre-treatment of cocoon and its influence on moisture content in cocoon shell. The productivity and raw silk recovery (quantity) has been shown to be dependent mainly on the cooking technology [Shimazaki (1964)]. The technology used for cooking, is to process the cocoon layer and soften sericin so that agglutination points are released [Kinoshita et al. (1982)].

However, information on the influence of vacuum permeation before cooking in respect of bivoltine cocoons is scanty. In this paper an attempt has been made to study the effect of vacuum permeation before cooking on the water absorption and reeling characteristics of bivoltine cocoons.

MATERIALS AND METHODS

Raw material:

Commercially available bivoltine cocoons i. e., CSR2 × CSR 4 race reared in Karnataka state in South India has been used for the study.

Drying conditions:

The bivoltine cocoons were dried in a batch type hot air drier, following the temperature profile of 110° - 100° - 85° - 70° - 55°C for a period of 5 hours to achieve the stifling of the pupae and complete drying of the cocoon apart from hardening the sericin on the filaments. This process achieves optimum degree of drying of 39 - 40(%). The cocoons thus dried were stored for a period of three months before reeling.

Vacuum permeation conditions before cooking:

The long stored hot air dried cocoons were vacuum permeated in water using a vacuum permeation chamber developed by CSTRI, following three levels of different vacuum pressures of 100, 200 and 300 mm Hg and vacuum duration of 30, 60 and 120 seconds duration for 1 and 2 cycles. The vacuum permeated cocoons were conditioned for a period of 30 minutes before cooking.

Cooking conditions:

The hot air dried and vacuum permeated cocoons were cooked using two-pan equipment following the temperature profile of 50°- 90°- 65°- 95°- 95° to 80°C for 7 minutes. The cooked cocoons were brushed at 80°C before reeling.

Experimental procedure:

The cocoons taken for water permeation were initially weighed to observe the dry cocoon weight (W1) and then cocoons were vacuum permeated. The cocoons were immediately weighed to observe the increase in weight (W2). Later, the water absorption by the cocoons was calculated using the following formulae [Koeke, 1964]:

Water absorption inside the cocoon = $W2 / W1$

W1 = Weight of dry cocoon before treatment

W2 = Weight of cocoons after vacuum treatment

Fifty cocoons per replication were taken for experiment. The results thus obtained were averaged to five values of ten cocoons each and the experiment was repeated with three batches of cocoons.

Reeling conditions:

The cooked cocoons were reeled on 3 ends of a multiend reeling machine producing 20/22denier raw silk. The temperature of reeling bath was maintained at 45° C and reeling speed at 120 m/min [Omura (1981)]. The silk reeled was re-reeled and converted into skeins. The silk skeins were conditioned and weighed for assessing reeling parameters.

Data collected:

The reelability data i. e., reelability percentage, raw silk percentage, raw silk recovery percentage and waste % on silk weight were observed while reeling different combinations of vacuum treated cocoons. To compare the results long stored cocoons were reeled without any vacuum treatment as control. The experiment was repeated with three batches of bivoltine cocoons and the data thus obtained were analysed by employing multivariate analysis.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The analysis of variance results of water absorption and reeling characteristics of vacuum treated cocoons are presented in Table I. The mean results of the water absorption and reeling characteristics of the cocoons treated with different vacuum pressures, duration and number of cycles are given in the Tables II, III and IV. The effect of vacuum pressures, durations and number of cycles, on water absorption (%), reelability (%), raw silk (%), raw silk recovery (%) and waste (%) on silk weight are given in Fig. 1 to 5.

Table I. Analysis of variance results of bivoltine cocoons treated with vacuum permeation before cooking.

Tableau I. Résultats de l'analyse de variance pour les cocons bivoltins traités par l'imprégnation sous vide avant la cuisson.

Source	Mean sum of squares					
	Degree of Freedom	Water absorption (%)	Reel-ability (%)	Raw silk (%)	Raw silk recovery (%)	Waste (%) on silk weight
	<i>Somme moyenne des carrés</i>					
	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Absorption de l'eau (%)</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>Récupération de soie grège (%)</i>	<i>(%) de déchets par rapport au poids de la soie</i>
Vacuum pressure / <i>Dépression (A)</i>	2	823269**	37.85**	3.29**	42.07**	12.65**
Vacuum duration / <i>Durée du vide (B)</i>	2	10425	27.04**	0.464	15.57**	5.47**
Vacuum cycle / <i>Cycle du vide (C)</i>	1	124916**	572.3**	2.48**	20.9**	4.09**
Vacuum pressure × Vacuum duration (A × B) <i>Dépression × durée du vide (A × B)</i>	4	2175	2.96	4.15×10^{-2}	0.153	0.244
Vacuum pressure × Vacuum cycle (A × C) <i>Dépression × cycle du vide (A × C)</i>	2	7880	2.96	5.59×10^{-2}	0.621	3.28×10^{-2}
Vacuum duration × Vacuum cycle (B × C) <i>Durée du vide × Nombre de cycles (B × C)</i>	2	16819*	1.07	4.91×10^{-3}	9.04×10^{-2}	7.41×10^{-2}
Error / <i>Ecart</i>	42	5420	12.753	0.662	9.898	1.008

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

Table II. Mean results of reeling characteristics of bivoltine cocoons treated with different vacuum permeation pressures before cooking.

Tableau II. Résultats moyens pour les caractéristiques de dévidage de cocons bivoltins traités avec différentes pressions d'imprégnation sous vide avant la cuisson.

Vacuum pressure (mm / Hg)	Water absorption (%)	Reelability (%)	Raw silk (%)	Raw silk recovery (%)	Waste (%) on silk weight
<i>Dépression (mm / Hg)</i>	<i>Absorption de l'eau (%)</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>Récupération de soie grège (%)</i>	<i>(%) de déchets par rapport au poids de la soie</i>
100	292.1	77.56	17.71	77.37	14.20
200	464.5	78.98	18.11	78.87	13.81
300	717.3	80.46	18.57	80.42	12.60
Control / Témoin	0	70.37	16.40	75.99	16.09
C.D at 5% / D. C. à 5 %	48.1	4.04	0.92	3.56	1.14

Table III. Mean results of reeling characteristics of bivoltine cocoons treated with different vacuum permeation durations before cooking.

Tableau III. Résultats moyens pour les caractéristiques de dévidage des cocons bivoltins traités avec différentes durées d'imprégnation sous vide avant la cuisson.

Vacuum duration (Seconds)	Water Absorption (%)	Reel- ability (%)	Raw silk (%)	Raw silk recovery (%)	Waste (%) on silk weight
<i>Durée du vide (secondes)</i>	<i>Absorption de l'eau (%)</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>Récupération de soie grège (%)</i>	<i>(%) de déchets par rapport au poids de la soie grège (%)</i>
30	475.9	77.79	17.95	77.82	14.17
60	478.9	78.95	18.18	79.28	13.23
120	519.0	80.24	18.26	79.56	13.21
Control / Témoin	0	70.37	16.40	75.99	16.09
C.D at 5%	48.1	4.04	0.92	3.56	1.14

Table IV. Mean results of reeling characteristics of bivoltine cocoons treated with different vacuum permeation cycles before cooking.

Tableau IV. Résultats moyens pour les caractéristiques de dévidage des cocons bivoltins traités avec différents cycles d'imprégnation sous vide avant la cuisson.

Vacuum cycle	Water Absorption (%)	Reel-ability (%)	Raw silk (%)	Raw silk recovery (%)	Waste (%) on silk weight
<i>Nombre de cycles du vide</i>	<i>Absorption de l'eau (%)</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>Récupération de soie grège (%)</i>	<i>(%) de déchets par rapport au poids de la soie</i>
1	443.2	75.74	17.92	78.26	13.81
2	539.4	82.25	18.35	79.51	13.26
Control / Témoin	0	70.37	16.40	75.99	16.09
C.D at 5%	68.0	5.72	1.30	5.03	1.61

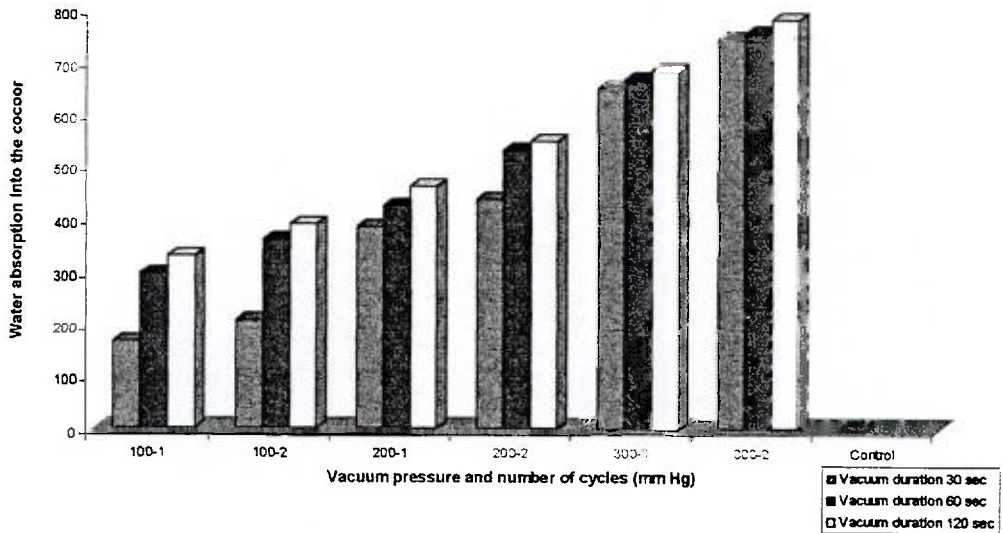


Fig. 1. Effect of vacuum pressure, duration and number of cycles before cooking on water absorption into the bivoltine cocoons.

Fig. 1. Effet de la dépression, de la durée et du nombre de cycles du vide avant la cuisson sur l'absorption de l'eau dans les cocons bivoltins.

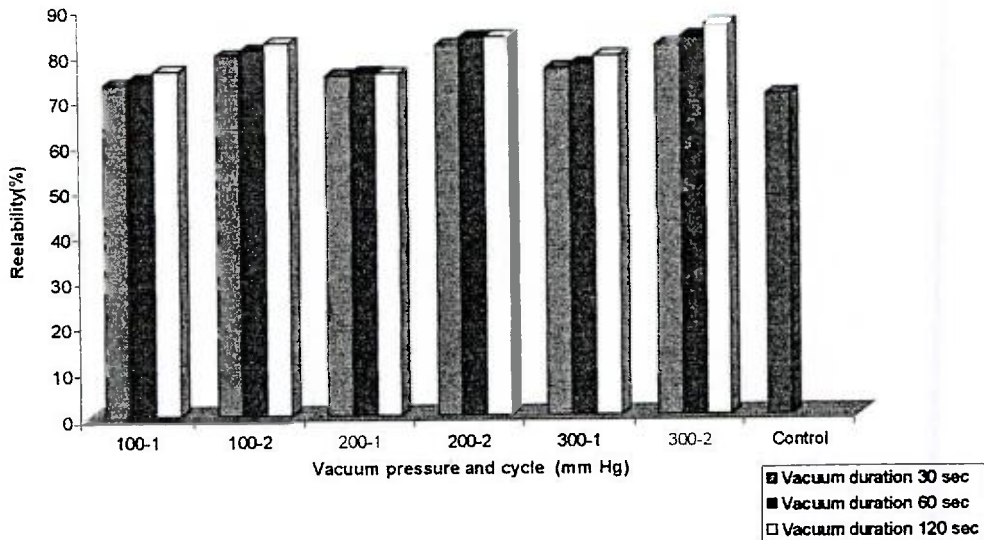


Fig. 2. Influence of vacuum pressure, duration and number of cycles on reelability of bivoltine cocoons.
Fig. 2. Influence de la dépression, de la durée et du nombre de cycles du vide sur la dévidabilité des cocons bivoltins.

1. Analysis of variance:

The analysis of variance (Table I) showed that significant difference exists among the water absorption and reeling performance of vacuum treated cocoons. The water absorption (%), reeling characteristics i.e., reelability (%), raw silk (%), raw silk recovery (%) and waste percentage on silk weight are significant factors, which are influenced by vacuum treatment of the cocoons at 1% level. The water absorption (%) and raw silk (%) were found not to have significant influence when treated with different vacuum durations. From the cross correlation effect, it could be observed that the interaction between vacuum duration and number of cycle has significant effect at 5% level, on water absorption characteristics. From the results, it could be inferred that the vacuum permeation treatment of long stored cocoons significantly improves the reeling characteristics by facilitating proper softening of sericin during cooking. The interaction effects between vacuum pressures, duration of vacuum treatments and cycles of treatments are found not to have any significant effect with water absorption and reeling characteristics.

2. Effect of vacuum permeation treatments on reeling characteristics:

a. Water absorption:

The ANOVA (Table I) indicate that water absorption by the cocoons is significantly influenced by vacuum pressures, durations and number of cycles at 1(%) level. The contribution factor of these factors on water absorption characteristics are 79.35%, 0.49% and 5.80% respectively. It could be observed from Table II that as the vacuum pressure increased from 100 mmHg to 300 mmHg, the water absorption by the cocoons increased by 60(%) indicating that vacuum permeation treatment before cooking improves the water absorption capacity significantly.

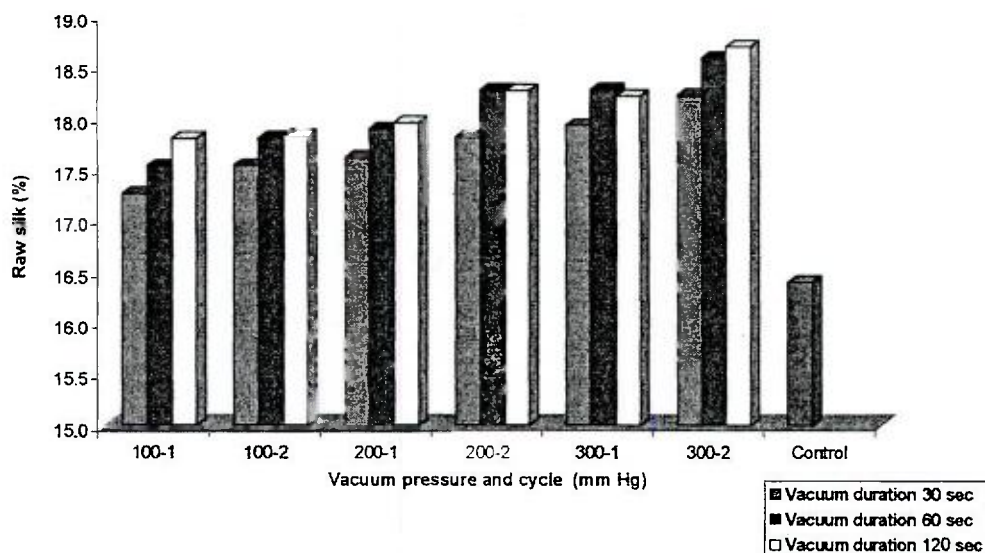


Fig. 3. Influence of vacuum pressure, duration and number of cycles on raw silk percentage of bivoltine cocoons.

Fig. 3. Influence de la dépression, de la durée et du nombre de cycles sur le pourcentage de soie grège des cocons bivoltins.

The results given in Table III indicate that vacuum duration too significantly influences water absorption by the cocoons. It is interesting to note that as the vacuum duration is increased from 30 seconds to 120 seconds, the water absorption increased by 8.3%. This is presumably due to the compact structure of bivoltine cocoons requiring higher durations to wet the shell. Similarly, the number of cycles of vacuum permeation treatment from 1 cycle to 2 cycles increases the water absorption percentage by 17.8% (Table IV). The Fig. 1 shows the effect of water absorption characteristics on vacuum treatments.

The C.D values at 5(%) level indicate that significant difference exists between water absorption characteristics when treated with vacuum pressures and number of cycles. However, the vacuum durations selected in the study did not show significant difference between the absorption of water. An increasing trend is observed in the absorption of water as the vacuum pressure, duration and number of cycles are increased. Thus it may be inferred that effective cooking of the cocoons and improvement in the reeling performance of cocoons was achieved only at 300 mm/Hg vacuum pressure, vacuum duration of 120 seconds for two cycles treatment.

b. Reelability percentage:

The ANOVA (Table I) indicate that reelability is significantly influenced by vacuum pressure, duration and number of cycles at 1% level. The contributions of these factors, on reelability percentage are 3.42%, 1.94% and 38.1% respectively. It could be observed (Table II) that as the vacuum pressure increased from 100 mmHg to 300 mmHg, the reelability is increased by 3.7%, compared to control (without vacuum treatment) the increase in reelability at 300 mmHg is 14.3%. This indicates that vacuum permeation treatment before cooking improves the reelability significantly.

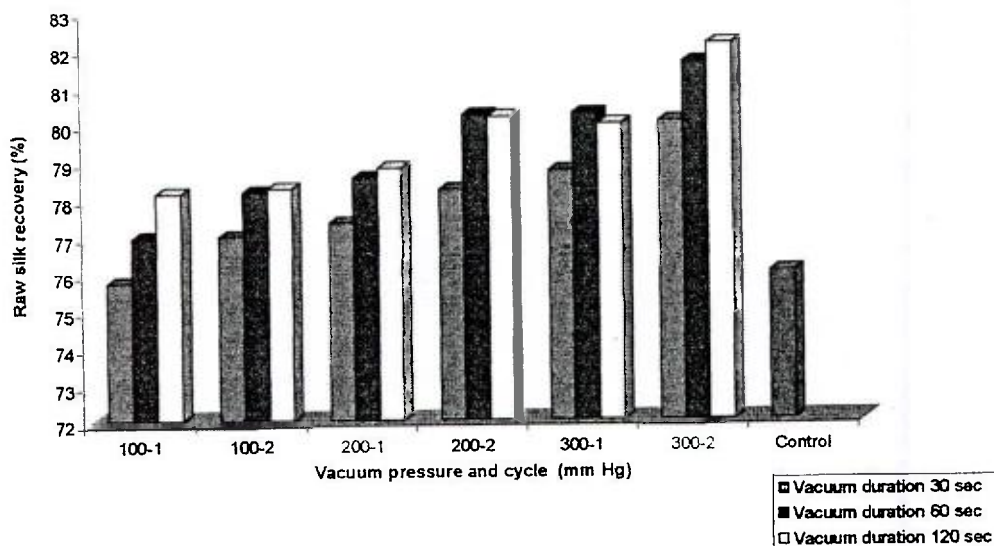


Fig. 4. Influence of vacuum pressure, duration and number of cycles on raw silk recovery percentage of bivoltine cocoons.

Fig. 4. Influence de la dépression, de la durée et du nombre de cycles du vide sur le pourcentage de récupération de soie grège chez les cocons bivoltins.

The results (Table III) indicate that vacuum duration too significantly influences reelability. It is interesting to note that as the vacuum duration is increased from 60 seconds to 120 seconds, the reelability increased by 14%. The number of cycles of vacuum permeation treatment from 1 cycle to 2 cycles increases the reelability percentage by 16.8% (Table IV). The Fig. 2 shows the effect of reelability on vacuum treatments.

The C.D values at 5% level indicate that a significant difference exists between reelability when treated with vacuum pressures, durations and number of cycles compared to control sample which were reeled without permeation. However, between the vacuum permeation treatments of 100 and 300 mm/Hg, vacuum durations of 60 seconds to 120 seconds, there is no significant difference in the reelability. The two-cycle treatment of vacuum permeation significantly improves the reelability of the cocoons. An increasing trend is observed in reelability as the vacuum pressures and durations are increased. Thus it may be inferred that the effective wetting was achieved only at 300 mm/Hg vacuum pressure, vacuum duration of 120 seconds for two cycles treatment, resulting in improvement of the reeling performance.

c. Raw silk percentage:

The ANOVA (Table I) indicate that raw silk percentage is significantly influenced by vacuum pressure and number of cycles at 1(%) level, whereas the vacuum duration did not show any influence on raw silk percentage. The contributions of these factors on raw silk percentage are 11.31% and 3.91% respectively. From Table II and Fig. 3, it could be observed that as the vacuum pressure is increased from 100 mmHg to 300 mmHg, the raw silk percentage is increased by 4.8% compared to

cocoons which are not vacuum treated the improvement is 13.2%. This may be attributed to the fact that long stored cocoons absorb more water on vacuum permeation.

Similar trend has been observed when the cocoons are treated with different vacuum durations and number of cycles as shown in Tables III and IV. The vacuum duration and number of cycles showed an improvement in raw silk percentage by 11.3% and 11.8% respectively, compared to the cocoons reeled without permeation. Thus it could be observed that vacuum treatment is a must for reeling long stored poor reelable cocoons. The C.D values at 5% level indicate that significant difference exists between raw silk percentage when treated with vacuum pressures, durations and number of cycles compared to control sample which were reeled without permeation.

d. Raw silk recovery percentage:

The ANOVA Table I indicate that, vacuum permeation treatment has significantly influenced the raw silk recovery percentage at 1% level. The contributions of these factors on raw silk percentage are 11.14 %, 1.96% and 1.92% respectively. From the results given in Tables II, III and IV, it could be observed that raw silk recovery percentage is significantly improved to the extent of 5.8%, 4.6 % and 4.6 %, when the cocoons are vacuum permeated at 300 mm Hg pressure, 120 seconds duration and two cycle vacuum treatment, compared to cocoons cooked and reeled without permeation treatment. Further an increasing trend was observed in raw silk recovery percentage as the vacuum levels, durations and cycles are increased. The Fig. 4 shows the effect of raw silk recovery percentage on vacuum treatments.

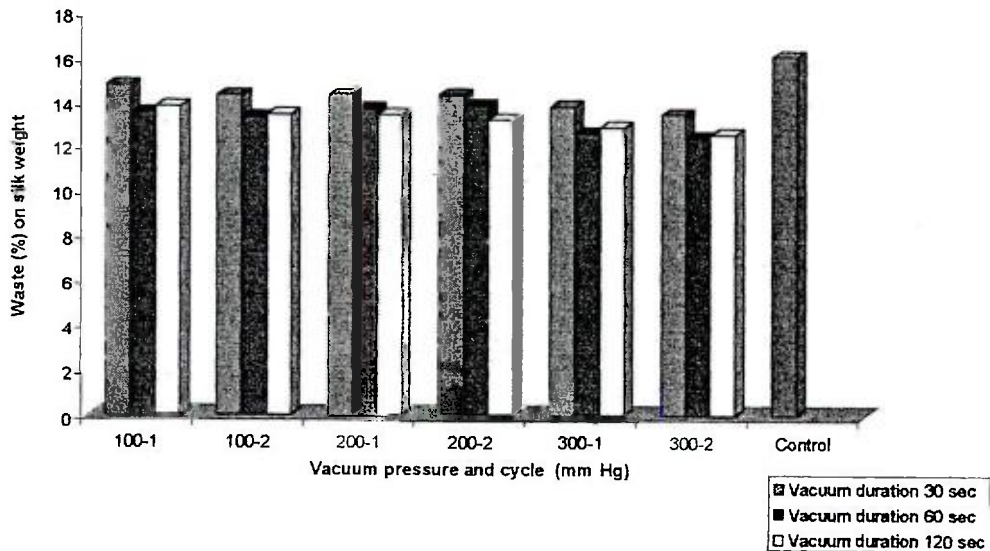


Fig. 5. Influence of vacuum pressure, duration and number of cycles on waste percentage of bivoltine cocoons.

Fig. 5. Influence de la dépression, de la durée et du nombre de cycles sur le pourcentage de déchets des cocons bivoltins.

The CD values also indicate significant difference between the vacuum permeation pressures of 300 mmHg, 120 seconds duration treatment on raw silk percentage compared to without treatment. However the number of cycles did not show difference in raw silk recovery percentage. This is attributed to effective wetting of the compact shell thickness of bivoltine cocoons. This further leads to effective permeation of water into the cocoons and softening of sericin at the crossover points of the cocoon filaments during cooking resulting in better reeling performance.

e. Waste (%) on silk weight:

The ANOVA (Table I) indicates that waste (%) on silk weight is significantly influenced by, vacuum pressure, duration and number of cycles at 1% level. The contributions of these factors on waste (%) on silk weight are 22.72%, 8.72% and 3.02% respectively. It could be observed that increase in the vacuum pressure from 100 to 300 mmHg, decreased the waste (%) on silk weight by 11.2%, compared to cocoons without vacuum treatment which is 21.6% (Table II). This would suggest that vacuum permeated long stored cocoons should be cooked for less time to soften the sericin as water absorption by the cocoon shell has already taken place.

Similarly, the vacuum duration and number of cycles of treatment also decreases the waste generation to the extent of 17.8% and 17.5% respectively when treated at 120 seconds for two-cycle treatment compared cocoons which are not vacuum permeated before cooking (Tables III and IV). The Fig. 5 shows the overall influence of vacuum permeation treatments on waste generated. The C.D values at 5% level indicate that significant difference exists between the vacuum pressures of 300mmHg, 120 seconds vacuum duration and two cycle treatment, on waste (%) on silk weight compared to cocoons reeled without permeation. Thus it is observed that vacuum permeation treatment reduces the waste generation significantly due to the presence of moisture induced during vacuum treatment.

CONCLUSION

Based on the above study, it is inferred that vacuum permeation of hot air dried long stored bivoltine cocoons prior to cooking improves water absorption and reeling characteristics. The study reveals that the bivoltine cocoons could be treated with vacuum pressure of 300 mm/Hg, for 120 seconds duration and 2 cycles treatment to improve the reeling performance.

ACKNOWLEDGEMENT

The thanks are due to reeling section staff of CSTRI, for their cooperation while conducting the study.

REFERENCES

- KOIKE R. MURAYAMA Z. (1953) "In regard to correct degree of softening of cocoons during cooking and cocoon volume / capacity relation", Filature and silk conference report, Vol. 3, pp. 89-94.
- KOIKE R. MURAYAMA Z. (1954) "In regard to cocoon shell swelling and cocoon volume relation", Cocoon testing research studies report, Vol. 13, pp. 9-12.
- KOIKE R. (1963a) "Studies on the pre-treatment before cooking I. In regard to water content of the cocoon", Filature and silk conference report, Vol. 13, pp. 28-33.
- KOIKE R. (1963b) "Studies on the pre-treatment before cooking II. Relation between brushing and thread troubles", Filature and silk conference report, Vol. 13, pp. 34-40.
- KOIKE R. (1963c) "Studies on the pre-treatment before cooking III. In regard to raw silk quality", Filature and silk conference report, Vol. 13, pp. 41-49

- KOIKE R. (1964) "In regard to cocoon shell water quantity variations in the pre-treatment before cooking I. Retting temperature, retting time and temperature gradient relations", Filature and silk conference report, Vol. 14, pp. 20-26.
- KINOSHITA H. KUSAMA T. KOIKE R. (1982) "Studies related to cocoon pre-treatment before cooking", Filature and silk conference report, Vol. 32, pp. 10-13.
- KINOSHITA H. (1997) "Development of optimum control method of cocoon cooking by the application of expert system", Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., No.19, Oct., pp. 13-20.
- OMURA T (1981) "Silk reeling technics in the tropics", Japan international cooperation agency, Tokyo, pp.69.
- SHIMAZAKI A. "Filature technology lecture", Published by sericultural association, Tokyo, (1964) 89.
- SHIMAZAKI A. YAMAMOTO A. (1962) "Study on pre-treatment of cocoon cooking II. Soaking treatment and cocoon shell permeability", J.Silk.Sci.Tech.Japan, Vol.12, pp.4-7

ETUDES SUR LE PRE-TRAITEMENT DES COCONS BIVOLTINS : INFLUENCE DES TRAITEMENTS D'IMPREGNATION SOUS VIDE AVANT LA CUISSON SUR L'ABSORPTION DE L'EAU ET LA PERFORMANCE DE DEVIDAGE DES COCONS BIVOLTINS APRES STOCKAGE LONG

G. HARIRAJ, SUBHAS V. NAIK, K. N. MAHESH, SANGAPPA N. SHILLIN & T. H. SOMASHEKAR

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

Le procédé de séchage à l'air chaud enlève complètement l'humidité de la coque soyeuse. Quand on stocke ces cocons pendant de longues périodes, les caractéristiques de dévidage sont affectées. Les études réalisées au CSRTI révèlent qu'en imprégnant ces cocons sous vide, avant la cuisson, cela facilite une imprégnation correcte des molécules d'eau dans les couches de la coque soyeuse, ce qui entraîne une cuisson uniforme et améliore donc la dévidabilité des cocons ainsi que leur performance de dévidage. Les cocons bivoltins pré-traités à 300 mm /Hg, pendant 120 secondes pendant 2 cycles en utilisant une chambre d'imprégnation sous vide donnent de meilleurs résultats. On constate que le processus de pré-traitement amollit la séricine en mouillant uniformément les couches de la coque soyeuse, ce qui améliore par-là même l'absorption de l'eau et les caractéristiques de dévidage, c'est à dire le pourcentage de dévidabilité, le pourcentage de soie grège, le pourcentage de récupération de soie grège et permet la diminution du pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie. Les études ont clairement fait ressortir qu'il est possible d'améliorer considérablement la performance de dévidage des cocons stockés pendant longtemps en imprégnant les cocons bivoltins sous vide avant la cuisson et le dévidage.

INTRODUCTION

Le mécanisme de cuisson des cocons se divise en quatre étapes : le pré-traitement avant la cuisson, le pré-traitement pour la cuisson, le traitement de cuisson et le traitement d'ajustement [Kinoshita (1997)]. L'eau qui pénètre à l'intérieur de la coque soyeuse au cours du processus de pré-traitement est liée à la pénétration de l'eau pendant le processus de cuisson [Shimazaki et Yamamoto (1962)]. Koike et Murayama (1953, 1954) et Koike (1963a, 1963b et 1963b) ont laissé entendre que la teneur en eau de la coque soyeuse est liée à la température de cuisson. Ces chercheurs ont aussi étudié le pré-traitement du cocon et son influence sur la teneur en humidité de la coque soyeuse. On a montré que la productivité et la récupération de soie grège (quantité) dépendent principalement de la technologie de cuisson [Shimazaki (1964)]. La technologie utilisée pour la cuisson consiste à transformer les couches soyeuses et à amollir la séricine de sorte que les points d'agglutination soient libérés [Kinoshita et coll., (1982)].

Cependant, l'information sur l'influence de l'imprégnation sous vide avant la cuisson chez les cocons bivoltins est rare. Dans cet article, nous avons essayé d'étudier l'effet de l'imprégnation sous vide avant la cuisson sur l'absorption de l'eau et sur les caractéristiques de dévidage des cocons bivoltins.

MATERIELS ET METHODES

Matière première :

On utilise des cocons bivoltins disponibles au niveau commercial c'est à dire la race CSR2 × CSR4 élevés dans l'état du Karnataka en Inde du sud.

Conditions de séchage :

Les cocons bivoltins sont étouffés dans un séchoir à air chaud par lots, en suivant le profil de température suivant de 110° - 100° - 85° - 70° - 55° C pendant une période de 5 heures pour parvenir à étouffer les nymphes et au séchage complet du cocon tout en durcissant la sérécine sur les filaments. Ce processus permet un degré optimum de séchage de 39 – 40 (%). On stocke les cocons séchés de cette manière pendant une période de trois mois avant le dévidage.

Conditions d'imprégnation à vide avant la cuisson :

Les cocons séchés à l'air chaud stockés depuis longtemps sont imprégnés sous vide dans de l'eau en utilisant une chambre d'imprégnation à vide mise au point par le CSRT1, en suivant trois niveaux différents de pression de vide de 100, 200 et 300 mm Hg et une durée de vide de 30, 60 et 120 secondes pendant 1 et 2 cycles. Les cocons imprégnés sous vide avant la cuisson sont conditionnés pendant une période de 30 minutes.

Conditions de cuisson :

Les cocons séchés à l'air chaud et imprégnés sous vide sont cuits en utilisant deux bassines et en suivant le profil de température de 50 ° - 90 ° - 65° - 95° - 95 ° à 80° C pendant 7 minutes. On purge les cocons cuits à 80° C avant le dévidage.

Procédure expérimentale :

On utilise les cocons avant la pénétration de l'eau pour mesurer le poids du cocon sec (W1) puis on imprégne les cocons sous vide. On pèse immédiatement les cocons pour observer l'augmentation de poids (W2). Plus tard, on calcule l'absorption de l'eau par les cocons en utilisant la formule suivante [Koeke, 1964] :

Absorption de l'eau à l'intérieur du cocon = $W2 / W1$

W1 = Poids du cocon sec avant le traitement

W2 = Poids des cocons après le traitement sous vide

On prend 50 cocons par répétition pour l'expérience. Une moyenne de cinq valeurs pour dix cocons est calculée à partir des résultats obtenus et on répète l'expérience avec trois lots de cocons.

Conditions de dévidage :

Les cocons cuits sont dévidés sur 3 bouts d'une bassine de dévidage multibouts produisant de la soie grège de 20/22 deniers. On maintient la température du bain de dévidage à 45° C et une vitesse de dévidage de 120 m / min [Omura (1981)]. On dévide à nouveau la soie dévidée et on la convertit en flottes. Les flottes de soie sont conditionnées et pesées pour évaluer les paramètres de dévidage.

Données recueillies :

On mesure les données de dévidabilité c'est à dire le pourcentage de dévidabilité, le pourcentage de soie grège, le pourcentage de récupération de soie et le pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie pendant le dévidage pour les différentes combinaisons de traitements des cocons. Pour comparer les résultats on dévide des cocons stockés depuis longtemps sans aucun traitement sous vide

comme témoins. On répète l'expérience avec trois lots de cocons bivoltins et on analyse les données obtenues en employant l'analyse multivariée.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'analyse de variance pour les caractéristiques de dévidage et l'absorption d'eau des cocons traités sous vide sont présentés dans le Tableau I. Les résultats moyens pour l'absorption de l'eau et les caractéristiques de dévidage des cocons traités avec des dépressions, des durées et des nombres de cycles de vide différents sont présentés dans les Tableaux II, III et IV. L'effet des dépressions, des durées et du nombre de cycles sur l'absorption de l'eau (%), la dévidabilité (%), la soie grège (%), la récupération de soie grège (%) et les déchets (%) par rapport au poids de la soie sont présentés dans les Figs. 1 à 5.

1. Analyse de variance :

L'analyse de variance (Tableau I) montre qu'il existe une différence significative pour l'absorption de l'eau et la performance de dévidage des cocons traités sous vide. L'absorption de l'eau (%), les caractéristiques de dévidage c'est à dire la dévidabilité (%), la soie grège (%), la récupération de soie grège (%) et le pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie sont des facteurs qui sont influencés par le traitement sous vide des cocons (significatifs au seuil de 1 %). L'absorption de l'eau (%) et la soie grège (%) ne dépendent pas de la durée du traitement sous vide. D'après l'effet de la corrélation croisée, on peut observer que l'interaction entre la durée du vide et le nombre de cycles a un effet significatif, au seuil de 5 %, sur les caractéristiques d'absorption de l'eau. D'après les résultats, on peut en déduire que le traitement d'imprégnation sous vide des cocons stockés pendant une longue durée améliore les caractéristiques de dévidage en facilitant le ramollissement de la sérécine pendant la cuisson. Les effets d'interaction entre les valeurs de vide, la durée des traitements sous vide et les cycles ne s'avèrent pas avoir un effet significatif sur l'absorption de l'eau et les caractéristiques de dévidage.

2. Effets des traitements d'imprégnation à vide sur les caractéristiques de dévidage :

a. Absorption de l'eau :

L'ANOVA (Tableau I) indique que l'absorption de l'eau par les cocons est très influencée par les dépressions, la durée et le nombre de cycles du vide au seuil de 1 %. La contribution de ces facteurs pour les caractéristiques d'absorption de l'eau sont respectivement de 79,35 % ; 0,49 % et 5,80 %. On peut observer d'après le Tableau II qu'alors que la dépression augmente de 100 mmHg, à 300 mmHg l'absorption de l'eau par les cocons augmente de 60 %, ce qui indique que le traitement d'imprégnation sous vide avant la cuisson améliore considérablement la capacité d'absorption de l'eau.

Les résultats présentés dans le Tableau III indiquent que la durée du vide influence aussi considérablement l'absorption de l'eau par les cocons. Il est intéressant de noter qu'alors que la durée du vide passe de 30 secondes à 120 secondes, l'absorption de l'eau augmente de 8,3 %. Cela est probablement dû à la structure compacte des cocons bivoltins qui ont besoin de durées plus longues pour mouiller leur coque. De même, quand le nombre de cycles du traitement d'imprégnation à vide passe de 1 à 2, cela augmente le pourcentage d'absorption de l'eau de 17,8 % (Tableau IV). La Fig. 1 montre l'effet des traitements sous vide sur les caractéristiques d'absorption de l'eau.

Les valeurs D. C. au seuil de 5 % indiquent qu'il existe une différence significative pour les caractéristiques d'absorption de l'eau en fonction des valeurs de dépressions et du nombre de cycles du vide. Cependant, les durées de vide sélectionnées dans l'étude n'entraînent pas une différence significative pour l'absorption de l'eau. On observe une tendance à l'augmentation de l'absorption de l'eau alors que la dépression, la durée et le nombre de cycles du vide augmentent. On peut donc en déduire qu'on obtient une cuisson efficace des cocons et l'amélioration de la performance de

dévidage des cocons seulement avec une dépression de 300 mm/Hg, une durée du vide de 120 secondes avec deux cycles de traitement.

b. Pourcentage de dévidage :

L'ANOVA (Tableau I) indique que la dévidabilité est considérablement influencée par la dépression, la durée et le nombre de cycles au seuil de 1 %. Les contributions de ces facteurs sur le pourcentage de dévidage sont respectivement de 3,42 % ; 1,94 % et 38,1 %. On peut observer (Tableau II) qu'alors que la dépression augmente de 100 mmHg à 300 mmHg, la dévidabilité augmente de 3,7 % par comparaison au témoin (sans traitement sous vide) et l'augmentation de la dévidabilité à 300 mmHg est de 14,3 %. Cela indique que le traitement d'imprégnation sous vide avant la cuisson améliore considérablement la dévidabilité.

Les résultats (Tableau III) indiquent que la durée du vide influence aussi considérablement la dévidabilité. Il est intéressant de noter qu'alors que la durée du vide augmente de 60 à 120 secondes, la dévidabilité augmente de 14 %. Le passage du nombre de cycles du traitement d'imprégnation sous vide de un à deux cycles augmente le pourcentage de dévidage de 16,8 % (Tableau IV). La Fig. 2 montre l'effet des traitements sous vide sur la dévidabilité.

Les valeurs D. C. au seuil de 5 % indiquent qu'il y a une différence significative pour la dévidabilité en fonction des traitements sous vide, de leurs durées et du nombre de cycles de vide par comparaison à l'échantillon témoin qui est dévidé sans imprégnation. Cependant, entre les traitements d'imprégnation sous vide de 100 et 300 mm/Hg et des durées de vide de 60 secondes et 120 secondes, il n'y a pas de différence significative de dévidabilité. Le traitement en deux cycles d'imprégnation sous vide améliore considérablement la dévidabilité des cocons. On observe une tendance à l'augmentation de la dévidabilité quand les dépressions et les durées du vide augmentent. On peut donc en déduire qu'on n'obtient une humidification efficace qu'à 300 mm / Hg de dépression, une durée du vide de 120 secondes pendant deux cycles de traitement, ce qui donne une amélioration de la performance de dévidage.

c. Pourcentage de soie grège :

L'ANOVA (Tableau I) indique que la valeur de la dépression et le nombre de cycles du vide influence considérablement le pourcentage de soie grège au seuil de 1 %, tandis que la durée du vide n'a pas d'influence. Les contributions de ces facteurs sur le pourcentage de soie grège sont respectivement de 11,31 % et 3,91 %. D'après le Tableau II et la Fig. 3, on peut observer qu'alors que la dépression augmente de 100 mmHg à 300 mmHg, le pourcentage de soie grège augmente de 4,8 % par comparaison aux cocons qui ne sont pas traités sous vide, l'amélioration est de 13,2 %. On peut attribuer cela au fait que les cocons stockés pendant longtemps absorbent plus d'eau lors de l'imprégnation sous vide.

On observe une tendance similaire quand on traite les cocons avec différentes durées et cycles de vide comme cela apparaît dans les Tableaux III et IV. La durée et le nombre de cycles du vide donnent une amélioration du pourcentage de soie grège respectivement de 11,3 % et de 11,8 %, par comparaison aux cocons dévidés sans imprégnation. On peut donc observer que le traitement sous vide est un plus pour dévider les cocons se dévidant mal, stockés depuis longtemps. Les valeurs D. C. au seuil de 5 % indiquent qu'il existe une différence significative pour le pourcentage de soie grège en fonction des dépressions, des durées et du nombre de cycles de vide par comparaison à l'échantillon témoin dévidé sans imprégnation.

d. Pourcentage de récupération de soie grège :

Le Tableau I de l'ANOVA indique que le traitement d'imprégnation sous vide influence considérablement le pourcentage de récupération de soie grège au seuil de 1 %. Les contributions de ces facteurs sur le pourcentage de soie grège sont de respectivement 11,14 % ; 1,96 % et 1,92 %. D'après les résultats présentés dans les Tableaux II, III et IV, on peut observer que le pourcentage de

récupération de soie grège s'améliore considérablement de 5,8 % ; 4,6 % et de 4,6 % quand on imprègne les cocons sous vide à 300 mm Hg de pression, une durée de 120 secondes et un traitement sous vide de deux cycles par comparaison aux cocons cuits et dévidés sans traitement d'imprégnation. De plus, on observe une tendance à l'augmentation du pourcentage de récupération de soie grège alors que les niveaux, les durées et les cycles du vide augmentent. La Fig. 4 montre l'effet des traitements sous vide sur le pourcentage de récupération de soie grège .

Les valeurs DC indiquent aussi une différence significative pour les dépressions de 300 mmHg et un traitement sous vide de 120 secondes sur le pourcentage de soie grège par comparaison à l'absence de traitement. Cependant, le nombre de cycles n'entraîne pas de différence pour le pourcentage de récupération de soie grège. On attribue cela à l'efficacité de l'humidification de l'épaisseur compacte de la coque des cocons bivoltins. Cela entraîne par la suite l'imprégnation efficace de l'eau dans les cocons et l'amollissement de la sérécine aux points de croisement des filaments du cocon pendant la cuisson, ce qui entraîne une meilleure performance de dévidage.

e. Pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie :

L'ANOVA (Tableau I) indique que le % de déchets par rapport au poids de la soie est considérablement influencé par la dépression, la durée et le nombre de cycles du vide au seuil de 1 %. Les contributions de ces facteurs sur le pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie sont de respectivement 22,72 % ; 8,72 % et de 3,02 %. On peut observer que l'augmentation de la dépression de 100 à 300 mmHg diminue le pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie de 11,2 % par comparaison aux cocons sans traitement sous vide chez qui il est de 21,6 % (Tableau II). Cela suggère que les cocons stockés depuis longtemps imprégnés sous vide doivent être cuits pendant moins longtemps pour anollir la sérécine puisque l'absorption de l'eau par la coque soyeuse a déjà eu lieu.

De même, la durée et le nombre de cycles du traitement sous vide diminuent aussi la génération de déchets à un degré de respectivement de 17,8 % et 17,5 % quand on les traite pendant 120 secondes deux fois par comparaison aux cocons qui ne sont pas imprégnés sous vide (Tableaux III et IV). La Fig. 5 montre l'influence générale des traitements d'imprégnation à vide sur les déchets générés. Les valeurs D. C. au seuil de 5 % indiquent qu'il existe une différence significative avec une dépression de 300 mmHg, une durée de vide de 120 secondes et un traitement de deux cycles sur le pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie par rapport aux cocons dévidés sans imprégnation. On observe donc que le traitement d'imprégnation sous vide diminue considérablement la génération de déchets grâce à la présence d'une humidité induite pendant le traitement à vide.

CONCLUSION

L'étude réalisée montre que l'imprégnation sous vide avant la cuisson des cocons bivoltins séchés à l'air chaud stockés pendant longtemps améliore l'absorption de l'eau et les caractéristiques de dévidage. L'étude révèle que les cocons bivoltins devraient être traités avec une dépression de 300 mm/Hg pendant une durée de 120 secondes et 2 cycles de traitement pour améliorer la performance de dévidage.

EX VITRO ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF IN VITRO SHOOTS OF MULBERRY VARIETY S54 (*MORUS INDICA* L.)

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

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

In vitro shoots of mulberry (*Morus indica* L.) variety – S54 were successfully rooted through *ex vitro* rooting technique. The shoots measuring 4-5 cm long each with 6-8 leaves obtained from direct and indirect organogenesis using non-embryogenic vegetative propagules under cultured conditions, were inserted directly into a culture bottle containing horticultural grade soilrite-mix :- peat : perlite : vermiculate (1:1:1 v/v) containing half strength MS salts fortified with NAA (1 mg/l) and maintained in culture room. After 15 days 12-14 roots were formed, which were then transferred to pots containing tissue culture grade soilrite-mix :- peat : perlite in 3:1 (v/v) for profuse rooting and simultaneous acclimatization. The well-developed plantlets were transferred to field with 98% survivability.

Keywords : *In vitro* shoots, direct and indirect organogenesis, soilrite, *ex vitro* rooting.

Abbreviations : MS - Murashige and Skoog
NAA - Naphthalene Acetic Acid
IAA - Indole Acetic Acid
IBA - Indole Butyric Acid

INTRODUCTION

During the last three decades, tremendous progress has been made in mulberry tissue culture, which is mainly confined to micropropagation through direct and indirect regeneration using different explants in which, *in vitro* rooting technique was practically employed as an additional step to obtain complete plantlets under culture conditions (Ohyama, 1970, Oka and Ohyama, 1974, Patel *et al.*, 1983, Chang, 1985, Ivanicka, 1987, Oshigane, 1989, Narayan *et al.*, 1989, Tewary and Subba Rao, 1990, Rao and Raghunath, 1993, Srinivasa *et al.*, 2001). At present, *ex vitro* rooting technique is commonly used for micropropagation of many plant systems in commercial establishments since it eliminates a step of *in vitro* rooting thereby reducing the overall cost of micropropagated plants (George, 1996). Therefore, in the present investigation, an efficient protocol has been developed for successful root initiation and simultaneous acclimatization of aseptic shoots using *ex vitro* rooting technology in mulberry variety-S54.

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

MATERIAL AND METHODS

Mulberry variety – S54 is a beneficial mutant evolved from Berhampore local through mutation breeding at CSR&TI, Mysore. This variety belongs to *Morus indica* L. of class *Dicotyledon*, sub class *Archichlamydae*, order *Urticales*, family *Moraceae* and genus *Morus* grown upto 4-6 mts as a tree, but commercially grown in the form of a bush.

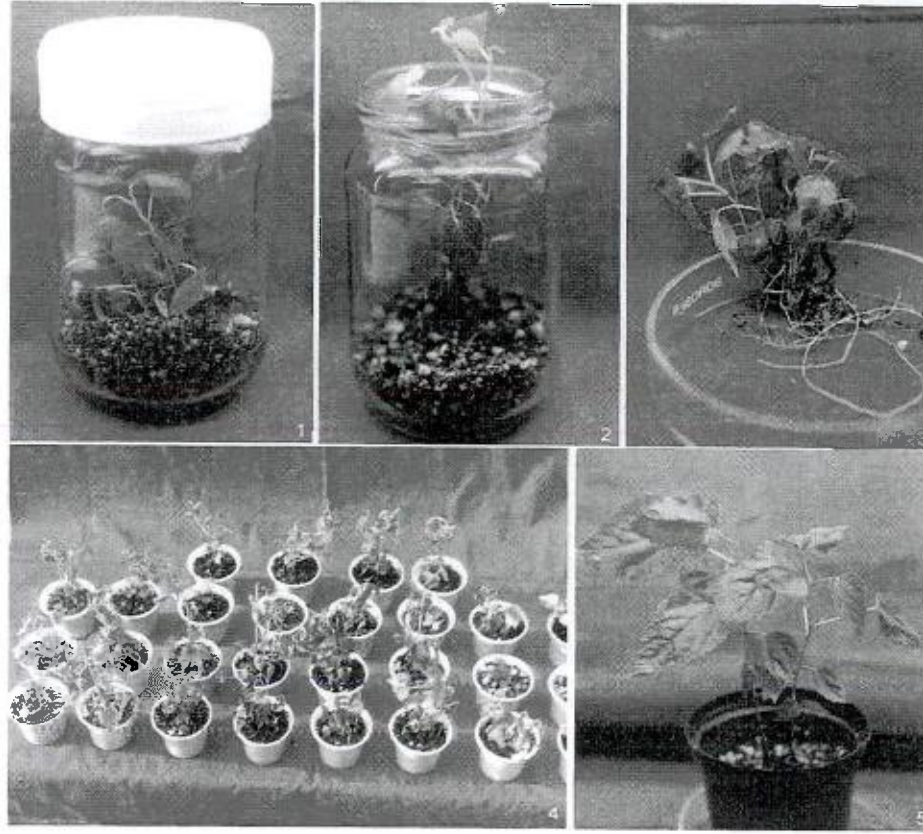
The well-developed multiple shoots derived from direct and indirect organogenesis of non-embryogenic vegetative propagules of mulberry variety-S54 were carefully taken out from the culture bottles and washed with sterile water to remove the traces of agar under aseptic conditions. These multiple shoots were inserted directly into culture bottle containing horticultural grade soilrite-mix : - peat : perlite : vermiculate (1:1:1 v/v) fortified with half strength MS salts and different concentrations of auxins NAA, IAA and IBA ranging from 0.5 – 2.0 mg l⁻¹ to study their efficiency on *ex vitro* rooting. The culture bottles with loose lids were maintained in a culture room at temperature 25 ± 2° C with a light at a photon density of 30-50 U Em⁻²s⁻¹ and Relative Humidity (RH) 55-60%. After 15 days, loosely covered caps were removed and plants were exposed to less humid conditions for the development of cuticle and epicuticular wax. After 7 days of exposure, rooted multiple shoots were taken out from bottle and transferred to pots containing tissue culture grade soilrite-mix : - peat : perlite in 3:1 (v/v) without any adjuvants for profuse rooting and simultaneous acclimatization. After 10 days, acclimatized plants were transferred to soil.

RESULTS

In the present investigation, it was noticed that the soilrite-mix : - peat : perlite : vermiculate (1:1:1 v/v) supplemented with half strength MS salts with NAA (1.0 mg l⁻¹) was found to be the best potting mixture for *ex vitro* rooting of shoots derived from direct and indirect organogenesis of *in vivo* and *in vitro* non-embryogenic vegetative propagules (Figs. 1 & 2). After 15 days, 12-14 roots were formed in each shoot (Fig. 3) when compared to IAA and IBA wherein 7-9 and 8-10 roots were formed at 1.5 mg l⁻¹ and 1.0 mg l⁻¹ respectively (Table I). After 7 days of exposure to less humid conditions, these rooted plants were transferred to tissue culture grade soilrite-mix : - peat : perlite (3:1 v/v) without any adjuvants. It was observed that the tissue culture grade soilrite-mix was found to be the best potting mixture to obtain profuse rooting and simultaneous acclimatization (Fig. 4). The acclimatized plants (Fig. 5) were successfully transferred to field with 98% survivability.

DISCUSSION

Ex vitro induction of roots now occupies an important place among the techniques available to plant biotechnologists. It offers a new opening for micropropagation of many plant systems, since it eliminates *in vitro* rooting step and reduces the overall cost of *in vitro* plants. In the present study, it was noticed that horticultural grade soilrite-mix : - peat : perlite : vermiculate (1:1:1 v/v) containing half strength MS salts fortified with NAA (1mg l⁻¹) was found to be the best potting mixture for *ex vitro* rooting of aseptic shoots of mulberry variety-S54. This does not coincide with the findings of Katase (1994) who has used vermiculate moistened with 0.5 mg l⁻¹ hyponex for planting the terminal shoot cuttings of proliferating cultures followed by mist treatment twice in an hour at green house for 15 mins under 20% natural daylight for *ex vitro* rooting in mulberry cultivar Mitsushigeri (*Morus bombycis* Koidz). In the present findings, profuse rooting and simultaneous acclimatization to natural conditions was achieved using tissue culture grade soilrite mix : - peat : perlite (3:1 v/v) without any adjuvants. This does not agree with the findings of Katase (1993) who has used vermiculate instead of soilrite-mix for hardening and acclimatization. Further, he has reported that the plantlets rooted well when supplied with 0.5-2.0 mg l⁻¹ hyponex once in a week in the green house condition without mist treatment.



Figures showing *ex vitro* rooting and acclimatization of *in vitro* raised plants of mulberry variety - S54 (*Morus indica* L.).

Figures montrant le racinement et l'acclimatation *ex vitro* des plants de la variété de mûrier - S54 (*Morus indica* L.) cultivés *in vitro*.

Fig. 1. *Ex vitro* rooting of aseptic shoots in culture bottle with loose lid. / Fig. 1. Racinement *ex vitro* de pousses aseptiques dans une bouteille de culture avec un couvercle lâche. Fig. 2. Exposing plants to less humid conditions after 15 days of transfer by removing the lid. / Fig. 2. Exposition des plants à des conditions moins humides au bout de 15 jours de transfert en enlevant le couvercle. Fig. 3. Rooted shoots after 21 days of transfer. / Fig. 3. Pousses racinées au bout de 21 jours de transfert. Fig. 4. Potted *in vitro* raised plants in different combinations of soilrite mix. / Fig. 4. Plants *in vitro* en pot cultivés dans différentes combinaisons de mélange de sol. Fig. 5. Acclimatized plants ready for transfer to field. / Fig. 5. Plants acclimatés prêts pour le transfert sur le terrain.

It was found in the present investigation, that the *ex vitro* rooted plants establish in soil easily when compared to *in vitro* rooted plants, because of the absence of vascular cambium in *in vitro* roots resulting in improper conduction of water and nutrients. Further, this *ex vitro* rooting technique is suitable and has special advantage for woody plants like mulberry in which secondary thickening is important for proper root functions. This coincides with the findings of McClelland *et al.*, (1990).

Table I. Effect of different concentrations of auxins in combination with soilrite mix for *ex vitro* rooting of aseptic shoots of mulberry variety – S54 (*Morus indica* L.).

Tableau I. Effet de différentes concentrations d'auxines en combinaison avec le mélange de sol pour le racinement *ex vitro* de pousses aseptiques de la variété de mûrier – S54 (*Morus indica* L.).

Soilrite mix (v/v)	Basal Media	Concentration of auxin (mg l ⁻¹)	No. of roots/culture
<i>Mélange de sol</i> (v/v)	<i>Milieu</i> <i>de base</i>	<i>Concentration</i> <i>d'auxine (mg l⁻¹)</i>	<i>Nbre de racines</i> <i>/ culture</i>
Peat : Perlite:Vermiculate <i>Tourbe : perlite :vermiculat</i> (1:1:1)	½ MS	NAA	
		0.5	8-10
		1.0	12-14
		1.5	10-11
		2.0	5-7
Peat : Perlite:Vermiculate <i>Tourbe : perlite :vermiculat</i> (1:1:1)	½ MS	IAA	
		0.5	5-6
		1.0	6-8
		1.5	7-9
		2.0	5-7
Peat:Perlite:Vermiculate <i>Tourbe : perlite :vermiculat</i> (1:1:1)	½ MS	IBA	
		0.5	5-8
		1.0	8-10
		1.5	7-9
		2.0	6-7

In conclusion, the protocol described in this paper is reproducible and superior to *in vitro* rooting because *in vitro* roots lack root hairs, vascular connections and may not begin to develop secondary cambium until removed from culture vessel and acclimatized. Further, the *in vitro* roots are likely to be damaged at the time of removal of plantlets from culture bottles and also they are prone to infection at the time of hardening. The utilization of this technique in woody plant like mulberry will definitely help in reducing the cost of *in vitro* plants and also in catering for the needs of the farmers at an affordable price for commercial exploitation.

ACKNOWLEDGEMENT

Financial assistance provided by Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), New Delhi, to one of the authors Kavyashree.R. is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- CHANG J.S. 1985. Tissue culture of winter shoots of Baigelu mulberry (*Morus ihou* Koidz) trees. Sanxi Agri. Sci. 3 : 17-18 (Ch).
- GEORGE E. F. 1996. In: George E. F. (Ed.), Plant propagation by tissue culture. Part 2 : In Practice, Exegetics Ltd., Edington, England. 699.
- IVANICKA J. 1987. *In vitro* micropropagation of mulberry, *Morus nigra* L. Scientia Horticulturæ (Netherlands) 31 (1) : 33-39.
- KATASE M. 1993. *Ex vitro* rooting and acclimatization of mulberry shoots. J. Seric. Sci. Jpn. 62 (5) : 420-427.
- KATASE M. 1994. Root initiation and acclimatization of mulberry shoots by the *ex vitro* rooting method with mist treatment. J. Seric. Sci. Jpn. 63 (4) : 293-298.
- KAVYASHREE R., GAYATRI M.C. & REVANASIDDIAIAH H.M. 2001. A repeatable protocol for the production of gynogenic haploid plants in mulberry. Sericologia 41(3) : 517-521.
- McCLELLAND M.T., SMITH M.A.L. & CAROTHERS Z.B. 1990. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 23 : 115-123.
- NARAYANA P., CHAKRABORTI S. & RAO G.S. 1989. Regeneration of plantlets from the callus of stem segments of matured plants of *Morus alba* L. Proc. Indian Nat. Sci. Acad. B55, 5 & 6: 469-472.
- OHYAMA K. 1970. Tissue culture in mulberry tree. JARQ 5 (1) : 30-34.
- OKA S. & OHYAMA K. 1974. Studies on *in vitro* culture of excised buds in mulberry tree. I. Effect of growth substance on the development of shoots and organ formation from winter buds. J. Seric. Sci. Jpn 43 (3) : 230-235 (J).
- OSHIGANE K. 1989. On the redifferentiation of shoot callus to different culture in mulberry. J. Fac. Text. Sci. Text. Sci. Tech. Shinshu Univ. E.Agr. Seric. 107: 38.
- PATEL G.K., BAPAT V.A. & RAO P.S. 1983. *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*. Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. Zeitschrift-fuer-Pflanzenphysiologie (Germany, F.R.) 111 (5) : 465-468.
- RAO S. & RAGHUNATH M.K. 1993. Callus initiation, growth and plant regeneration in mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. J. Swamy Bot. Club. 10 : 17-21.
- SRINIVASA M.N., REVANASIDDIAIAH H.M., GAYATRI M.C. & KAVYASHREE R. 2001. Indirect organogenesis through stem callus in mulberry variety Berhampore Local. Sericologia 41(1) : 101-104.
- TEWARY P.K. & SUBBA RAO G. 1990. Multiple shoot formation through shoot apex culture of mulberry. Indian Journal of Forestry 13(2) : 109-111.

RACINEMENT ET ACCLIMATATION *EX VITRO* DE POUSSES DE LA VARIÉTÉ DE MURIER S54 (*MORUS INDICA* L.) *IN VITRO*

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

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

Les pousses de la variété de mûrier Morus indica L. – S54 obtenues in vitro racinent avec succès grâce à une technique de racinement ex vitro. On insère directement des pousses de 4 à 5 cm de long avec 6 à 8 feuilles obtenues par organogenèse directe et indirecte dans des conditions de culture en utilisant des propagules végétatifs non embryogènes dans une bouteille de culture contenant un mélange de sol pour l'horticulture : tourbe : perlite : vermiculat (1 : 1 : 1 v/v) et des sels MS à moitié concentrés avec du NAA (1 mg l⁻¹) que l'on conserve dans une pièce de culture. Au bout de 15 jours, 12 à 14 racines étant formées, on les transfère dans des pots contenant un mélange de sol pour la culture des tissus : tourbe 3 : perlite 1 (v/v) pour obtenir un racinement abondant et une acclimatation simultanée. Les plants bien développés sont transférés sur le terrain avec une survie de 98 %.

Abréviations :	MS	Murashige et Skoog
	NAA	Acide Acétique Naphtalène
	IAA	Acide Acétique Indole
	IBA	Acide Butyrique Indole

INTRODUCTION

Au cours des trois dernières décennies, on a réalisé des progrès formidables dans la culture des tissus de mûrier, qui se limitent principalement à la micromultiplication par la régénération directe et indirecte de différents explants avec une technique de racinement *in vitro* qui comporte une étape supplémentaire pour obtenir des plants complets dans des conditions de culture (Ohyama, 1970 ; Oka et Ohyama, 1974, Patel et coll., 1983, Chang, 1985, Ivanicka, 1987, Oshigane, 1989, Narayan et coll., 1989, Tewary et Subba Rao, 1990, Rao et Raghunath, 1993, Srinivasa et coll., 2001). Aujourd'hui, on utilise couramment une technique de racinement *ex vitro* pour la micro-multiplication de nombreux systèmes de plantes dans les établissements commerciaux car elle permet d'éliminer une étape du racinement *in vitro*, ce qui diminue donc le coût total de la micromultiplication des plants (George, 1996). Dans cette étude, nous avons donc mis au point un protocole efficace pour obtenir une ébauche de racine et l'acclimatation simultanée des pousses aseptiques en utilisant une technologie de racinement *ex vitro* avec la variété de mûrier S-54.

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

MATERIELS ET METHODES

La variété de mûrier – S54 est un mutant bénéfique mis au point à partir de Berhampore local par lignage de mutation au CSR&TI, à Mysore. Cette variété appartient à *Morus indica* L. classe *Dicotyledon*, sous-classe *Archichlamydae*, ordre *Urticales*, famille *Moraceae* et genre *Morus* qui pousse jusqu'à 4 à 6 m comme arbre, mais que l'on cultive commercialement sous forme de buissons.

Les pousses multiples bien développées dérivées de l'organogénèse directe et indirecte de propagules végétatives non embryogènes de la variété de mûrier S54 sont soigneusement retirées des flacons de culture et lavées avec de l'eau stérile pour enlever les traces d'agar dans des conditions aseptiques. On insère directement ces pousses multiples dans une bouteille de culture contenant un mélange de sol tourbe : perlite : vermiculat (1 : 1 : 1 v/v) pour l'horticulture, fortifié avec des sels MS à moitié concentrés et différentes concentrations d'auxines, NAA, IAA et IBA comprises entre 0,5 et 2 mg l⁻¹ pour étudier l'efficacité du racinement *ex vitro*. On maintient les flacons de culture avec des couvercles desserrés dans une pièce à une température de 25 ± 2° C, avec une lumière d'une densité de photons de 30-50 U Em⁻²s⁻¹ et une humidité relative (RH) de 55 à 60 %. Au bout de quinze jours, on retire les couvercles et on expose les plants à des conditions moins humides pour le développement de la cuticule et de la cire de l'épicuticule. Au bout de 7 jours d'exposition, on sort les pousses multiples racinées de la bouteille et on les transfère dans des pots contenant un mélange de sol pour la culture des tissus tourbe : perlite 3 : 1 (v/v) sans aucun adjuvant pour obtenir un racinement abondant et une acclimatation simultanée. Au bout de 10 jours, on transfère les plants acclimatés dans le sol.

RESULTATS

Dans cette étude, le mélange de sol tourbe : perlite : vermiculat (1 : 1 : 1 v/v) additionné avec des sels MS à moitié concentrés et du NAA (1 mg l⁻¹) s'avère le meilleur mélange en pot pour le racinement *ex vitro* de pousses dérivées de l'organogénèse directe et indirecte de propagules végétatives non embryogènes *in vivo* et *in vitro* (Figs. 1 & 2). Au bout de 15 jours, 12 à 14 racines se forment sur chaque pousse (Fig. 3) par comparaison à l'IAA et à l'IBA avec lesquels 7 à 9 et 8 à 10 racines se forment avec 1,5 mg l⁻¹ et 1 mg l⁻¹ respectivement (Tableau 1). Au bout de 7 jours d'exposition à des conditions moins humides, on transfère ces plants racinés dans un mélange de sol pour la culture des tissus tourbe : perlite (3 : 1 v/v) sans aucun adjuvant. On constate que le mélange de sol adapté à la culture des tissus est le meilleur mélange pour obtenir un racinement abondant et une acclimatation simultanée (Fig. 4). On transfère les plants acclimatés avec succès sur le terrain avec une survie de 98 %.

DISCUSSION

L'induction de racines *ex vitro* occupe maintenant une place importante parmi les techniques disponibles pour les biotechnologistes dans le domaine des plantes. Elle offre de nouvelles possibilités pour la micromultiplication de nombreux systèmes de plantes, puisqu'elle élimine l'étape du racinement *in vitro* et diminue le coût général des plants *in vitro*. Dans cette étude, on constate que le mélange de sol pour horticulture, tourbe : perlite : vermiculat (1 : 1 : 1 v/v) contenant des sels MS à moitié concentrés avec du NAA (1 mg l⁻¹) est le meilleur mélange pour le racinement *ex vitro* de pousses aseptiques de la variété de mûrier S54. Cela ne coïncide pas avec les observations de Katase (1994) qui a utilisé du vermiculat humidifié avec 0,5 mg l⁻¹ d'hypoxone pour planter des boutures de pousses terminales de cultures en prolifération suivi par un traitement de brumisation deux fois par heure dans une serre pendant 15 minutes avec 20 % de lumière naturelle pour le racinement *ex vitro* du cultivar de mûrier Mitsushigeri (*Morus bombycis* Koidz.). Dans nos travaux, on obtient un racinement abondant et une acclimatation simultanée dans des conditions naturelles en utilisant un mélange de sol pour la culture des tissus, tourbe : perlite (3 : 1 v/v) sans aucun adjuvant. Cela n'est pas en accord avec les observations de Katase (1993) qui a utilisé du vermiculat à la place du mélange

de sol pour le durcissement et l'acclimatation. De plus, il a rapporté que les plants racinent bien quand on leur apporte 0,5 à 2 mg l⁻¹ d'hyponex une fois par semaine en serre sans brumisation.

Dans nos recherches, nous avons constaté que les plants racinés *ex vitro* s'établissent facilement dans le sol par comparaison aux plants racinés *in vitro* en raison de l'absence de zone vasculaire des racines *in vitro*, ce qui donne une mauvaise transmission de l'eau et des nutriments. De plus, cette technique de racinement *ex vitro* est adaptée et présente des avantages pour les plantes ligneuses comme le mûrier chez qui l'épaississement secondaire est important pour des fonctions correctes de la racine. Cela coïncide avec les observations de McClelland et coll., (1990).

En conclusion, le protocole décrit dans cet article est reproductible et supérieur au racinement *in vitro* parce que les racines *in vitro* manquent de poils radiculaires, de transmissions vasculaires et il se pourrait qu'elles ne développent pas de zone secondaire avant le retrait du récipient de culture et l'acclimatation. De plus, il est probable que les racines *in vitro* sont abîmées au moment du retrait des plants des bouteilles de culture et qu'elles sont sujettes à des infestations au moment du durcissement. L'utilisation de cette technique chez les plantes ligneuses comme le mûrier permet de considérablement réduire le coût des plants *in vitro* et de répondre aussi aux besoins des fermiers à un prix abordable pour l'exploitation commerciale.

STUDY ON ANTAGONISTIC EFFECT OF *TRICHODERMA* SPP. FROM GUILAN PROVINCE (IRAN) ON *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*, CAUSAL AGENT OF BUD AND TWIG DIE-BACK OF MULBERRY TREES

A. MERAT¹, S. A. M. MOGHADAM² & H. ROUHANI³

1. Research Dep., Iran Silkworm Rearing Co., Rasht., I.R.Iran.

2. Tea Research Institute, Lahidjan, Iran.

3. Plant Protection Dept. Bu-Ali Sina Univ., Hamadan, Iran.

In this study, the antagonistic effects of Trichoderma koningii, T. hamatum, T. aureoviride, T. pseudokoningii, T. saturnisporum, T. longibrachiatum and T. harzianum isolated from mulberry fields of Guilan province (Iran), on Sclerotinia sclerotiorum, causal agent of bud and twig die-back of mulberry trees, were investigated. For this purpose, the colonization ability, lysis property and volatile metabolites inhibition ability of the isolates were studied by means of dual culture and superposal petridishes methods. In vitro the results were as below:

In dual culture method, Shalman isolated T. harzianum (TH-2), Pasikhan isolated T. harzianum (TH-3), Parnian isolated T. harzianum (TH-4) suppressed the mycelial growth of S. sclerotiorum and parasitized them after 48 hours.

In superposal petridishes method after one week, Chophol isolated T. pseudokonigii (TP-1), Parnian isolated T. harzianum (TH-4) were more effective to inhibit the growth of S. sclerotiorum.

Parnian isolated T. harzianum showed the highest effectiveness on destruction and lysis of S. sclerotiorum after 40 days.

Keywords: Biocontrol agents, mulberry, twig die-back, *Sclerotinia sclerotiorum*.

INTRODUCTION

Sclerotinia sclerotiorum the causal agent of mulberry twig die-back is a polyphagous fungus that damages many horticultural crops and fruit trees. It also damages ornamental plants and vegetables. *S. sclerotiorum* was reported on mulberry in Bulgaria for the first time in 1932 by Christoff (Annonym, 1953). Mirhosseini Moghaddam *et al.* reported the fungus on mulberry trees in Iran in 1986. They also investigated its biology. They showed that damage on two Japanese varieties, Ichinose and Shin-Ichinose was over 50% in June. During recent years, its damage on local varieties of mulberry has been noticeable. According to references, using antagonistic fungi is very successful for biological control of some important soil fungi as *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp. and *Rhizoctonia* spp. Some species of *Trichoderma* have shown to be effective on *S. sclerotiorum* in eggplants. The antagonistic fungus covered the surface of a sclerotium colony in a short time and prevented sclerote formation. Non-volatile metabolites inhibited sclerote germination and also mycelial growth (Amirsadeghi *et al.*, 1993). Colonization of mycelia and sclerotia of *Rhizoctonia solani*, the agent of seed rot, root rot and damping off in many plants like bean, by means of some isolates of *Trichoderma* has been studied

by Bazgir *in vitro*. In this investigation, some isolates which were strong mycoparasites, controlled disease with non-volatile metabolites production and penetration in pathogen hyphae. Sometimes they fragmented mycelia and inhibited mycelial growth. Luo *et al.* (1990) showed that 7 strains of *T. viride* had high effectiveness (over 90%) on sclerotium lysis of *S. sclerotiorum* if 100 spores were mixed with one gram soil. Spraying of *T. harzianum* spore suspension (1.8×10^6 spore in each plant) on leaves surface and around the plants with continuous wetting for 2 to 3 days is very effective for controlling sclerotinia rot of lettuce (Avila de Moreno, C. & Guterrez de Gerardino; 1992). The seed treatment of sunflower with *Gliocladium virens* has been effective for disease control (Burgess & Hepworth, 1996). Many kinds of commercial antagonistic fungi were introduced on the market in granule or powder form. As it was the first study on biological control of sclerotinia die-back of mulberry in Iran, it was necessary to recognize the local isolates of antagonists which were more susceptible to environment and it was the most important purpose in this investigation. This study showed satisfactory conclusion *in vitro*. By the way, recognition of *Trichoderma* spp. in mulberry fields of Guilan province has been done for the first time.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of biocontrol agent from soil:

The soil samples were collected from mulberry fields of different areas of Guilan province. Collected soil were irrigated every alternated day for one week untill existing mycelia and spores were activated. After preparing, the soil suspension was added to petridishes which contain liquid water agar. They were mixed each other equally and then the media coagulated under laboratory condition. For isolating of fungal antagonistic agent, Davet medium was used. a 10mm plug of water agar and soil suspension prepared before, was cut with a cork borer and placed at the centre of petridishes containing Davet medium. Each soil sample was cultured in 10 petridishes separately. Petridishes were incubated at 25° C for 48 hours in the darkness. Then they were incubated in the natural light at 25° C. After growth of fungus colonies and sporulation, they were purified with monohyphae and monospore (Streets, 1997). The pure cultures were maintained in Potato Dextrose Agar (PDA) medium (Streets, 1997). 20 isolates obtaining from soil, were belonging to 7 species of *Trichoderma*.

Reproduction of pathogen sclerotia:

For this purpose millet seeds were soaked. Putting the seeds in 1000cc Erlenmeyer, distilled water was added untill the volume reached 600cc. After sterilization at 120° C and 1.5 atm. a 10mm plug of 72 hours culture of *S. sclerotiorum* was inoculated to Erlenmeyer. It was incubated at 18-20° C for 25 days. After sclerotia formation, they were sterilized with sublimate for 1 minute. After washing with distilled water and drying with paper, they were collected and incubated in refrigerator.

Study on growth speed, colonization and sporulation of antagonistic agent:

In order to choose the fast growth isolates with abundant spores, the biological agent was cultured on Potato Dextrose Agar. After 72 hours, a 8mm disc from each isolate, was put in the center of petridishes containing PDA medium. Petridishes were incubated at 25° C. Each treatment was replicated thrice. Colonization and sporulation were measured after 48 and 72 hours.

Study on interaction between the biological agent and *S. sclerotiorum* by means of dual culture method:

Each biocontrol agent was cultured with pathogen in a petridish. The plugs of pathogen cut with cork borer were put in a petridish at 5cm distance from each other. For control treatment, one disc of PDA medium without antagonist mycelia was used. After incubation at 25° C for 48 hours the antagonistic characteristics were investigated.

Study on volatile metabolites of chosen biocontrol agent on mycelial growth of *S. sclerotiorum* by means of superposal petridishes method:

The plug of young mycelia of *S. sclerotiorum* and also a four-day mycelium of *Trichoderma* were cultured separately and petridishes were placed above each other. The edge of them was closed with parafilm. The super-posal petridishes were incubated in 25° C and the inhibition percentage of sclerotinial growth was measured after 72 hours and one week as from the following formula:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Sclerotinial growth diameter in control petri dishes} - \text{Sclerotinial growth diameter affected with volatile metabolites}}{\text{Sclerotinial growth diameter in control petri dishes}}$$

Study on lysis ability of biocontrol agent of *S. sclerotiorum* in vitro :

The biological agents were cultured on PDA medium. When the antagonistic fungi covered the surface of plates completely, 20 sclerotia of *S. sclerotiorum* were placed in each petridish. For each antagonistic fungus three replications were taken into consideration. For control treatment, sclerotia were placed on PDA medium without antagonist. The petridishes were incubated at 25° C for 40 days. By giving light on the surface of sclerotia, their lysis was investigated with needle. The lysed sclerotia were counted and lysis ability between isolates of *Trichoderma* was compared.

All data were set and analysed with IRRISTAT* statistical software. Finally we compared them by means of Duncan's test (Yazdi Samadi *et al.*, 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Choosing the best isolates from the viewpoint of colony growth speed and sporulation:

9 isolates from 20 were chosen in a primary selection. Colony growth and sporulation of isolates were investigated by measuring the colony size and sporulation after 48 and 72 hours and 6 isolates which belonged to three species of *Trichoderma* were chosen. "Soltanmoradi" isolate of *T. pseudokoningii* (TP-1), "Chophol" isolate of *T. pseudokoningii* (TP-2), "Shalman" isolate of *T. harzianum* (TH-2), "Pasikhan" isolate of *T. harzianum* (TH-3), "Parnian" isolate of *T. harzianum* (TH-4) and "Pasikhan" isolate of *T. longibrachiatum* had the highest growth speed and the most sporulation compared to the others (Tables I & II).

Study on interaction between the biological agent and *S. sclerotiorum* by means of dual culture method:

Based on the results of dual culture of *Trichoderma* species and *S. sclerotiorum*, "Shalman" isolate of *T. harzianum* (TH-2), "Pasikhan" isolate of *T. harzianum* (TH-3) and "Parnian" isolate of *T. harzianum* (TH-4) could colonize and parasitize the mycelia of sclerotia. They also prevented the mycelial growth on PDA medium (Table III).

Study on volatile metabolites of chosen biocontrol agent on mycelial growth of *S. sclerotiorum* by means of superposal petridishes method:

Investigation of volatile metabolites effects of antagonist fungi on pathogen showed that "Chophol" isolate of *T. pseudokoningii* (TP-2) and "Parnian" isolate of *T. harzianum* (TH-4) had the most effect for inhibiting the pathogen growth after 72 hours (Table IV).

* International Rice Research Institute STAT.

Table I. Colony growth speed and sporulation ability of isolates of *Trichoderma*.**Tableau I. Vitesse de croissance des colonies et capacité de sporulation des isolats de *Trichoderma*.**

Antagonist	Source	Colony diameter in mm (after 48 hours)	Colony diameter in mm (after 72 hours)
<i>Antagoniste</i>	<i>Source</i>	<i>Diamètre de la colonie en mm (après 48 hrs)</i>	<i>Diamètre de la colonie en mm (après 72 hrs)</i>
<i>T. koningii</i>	Chamkhale	56.7 ^{bc}	80.5 ^b
<i>T. pseudokoningii</i> (TP-1)	Soltanmoradi	86.5 ^a	97.0 ^a
<i>T. harzianum</i> (TH-1)	Soltanmoradi	35.2 ^d	55.0 ^c
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	Shalman	36.7 ^d	88.3 ^{ab}
<i>T. harzianum</i> (TH-3)	Pasikhan	56.0 ^{bc}	97.0 ^a
<i>T. longibrachiatum</i>	Pasikhan	82.0 ^a	96.7 ^a
<i>T. hamatum</i>	Pasikhan	23.3 ^c	44.0 ^d
<i>T. pseudokoningii</i> (TP-2)	Chophol	85.0 ^a	97.0 ^a
<i>T. harzianum</i> (TH-4)	Parnian	63.3 ^b	97.0 ^a

Means followed by different letters are significantly different at 5% level ($P < 0.05$) by DMRT. / Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % ($P < 0.05$) par DMRT.

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level ($P < 0.05$) by DMRT. / Les moyennes suivies par une lettre commune ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % ($P < 0.05$) par DMRT.

Table II. Description of antagonists from the viewpoint of sporulation and pigment production.**Tableau II. Description des antagonistes en fonction de la sporulation et de la production de pigments.**

Biocontrol agent	Source	Species description
<i>Agent de lutte biologique</i>		<i>Description de l'espèce</i>
<i>T. koningii</i>	Chamkhale	Low ability of sporulation, little pigment production <i>Faible capacité de sporulation, faible production de pigments</i>
<i>T. pseudokoningii</i> (TP-1)	Soltanmoradi	High ability of sporulation, pigment production <i>Capacité élevée de sporulation, production de pigments</i>
<i>T. harzianum</i> (TH-1)	Soltanmoradi	Mediocre ability of sporulation, little pigment production <i>Capacité médiocre de sporulation, faible production de pigments</i>
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	Shalman	Mediocre ability of sporulation, little pigment production <i>Capacité médiocre de sporulation, faible production de pigments</i>
<i>T. harzianum</i> (TH-3)	Pasikhan	High ability of sporulation, pigment production <i>Capacité élevée de sporulation, production de pigments</i>
<i>T. longibrachiatum</i>	Pasikhan	High ability of sporulation, pigment production <i>Capacité élevée de sporulation, production de pigments</i>
<i>T. hamatum</i>	Pasikhan	Low ability of sporulation, little pigment production <i>Faible capacité de sporulation, peu de production de pigments</i>
<i>T. pseudokoningii</i> (TP-2)	Chophol	High ability of sporulation, pigment production <i>Capacité élevée de sporulation, production de pigments</i>
<i>T. harzianum</i> (TH-4)	Parnian	High ability of sporulation, pigment production <i>Capacité élevée de sporulation, production de pigments</i>

Table III. Interaction between antagonist and pathogen in dual culture.*Tableau III. Interaction entre l'antagoniste et le pathogène dans la culture double.*

Antagonist	Antagonist colony diameter (mm)	Pathogen colony diameter (mm)
<i>Antagoniste</i>	<i>Diamètre de la colonie de l'antagoniste (mm)</i>	<i>Diamètre de la colonie du pathogène (mm)</i>
<i>T. pseudokoningii</i> (TP-1)	58.3 ^b	31.7 ^{ab}
<i>T. harzianum</i> (TH-1)	63.3 ^a	28.3 ^{ab}
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	61.0 ^{ab}	23.3 ^a
<i>T. longibrachiatum</i>	54.0 ^c	33.3 ^b
<i>T. harzianum</i> (TH-3)	56.7 ^{bc}	28.3 ^{ab}
<i>T. harzianum</i> (TH-4)	60.7 ^{ab}	25.0 ^{ab}

Means followed by different letters are significantly different at the 5% level ($P < 0.05$) by DMRT. / Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % ($P < 0,05$) par DMRT.

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level ($P < 0.05$) by DMRT. / Les moyennes suivies par une lettre commune ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % ($P < 0,05$) par DMRT.

Table IV. Inhibition percentage of sclerotial growth impressing the volatile antibiotics of isolates of *Trichoderma*.*Tableau IV. Pourcentage d'inhibition de la croissance sclérotiale par les antibiotiques volatiles des isolats de Trichoderma.*

Biocontrol agent	Inhibition percentage
<i>Agent de lutte biologique</i>	<i>Pourcentage d'inhibition</i>
<i>T. pseudokoningii</i> (TP-1)	74.10 ^{ab}
<i>T. harzianum</i> (TH-1)	46.73 ^c
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	74.10 ^{ab}
<i>T. longibrachiatum</i>	60.40 ^{bc}
<i>T. harzianum</i> (TH-3)	88.40 ^a
<i>T. harzianum</i> (TH-4)	82.13 ^a

Means followed by different letters are significantly different at the 5% level ($P < 0.05$) by DMRT. / Les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % ($P < 0,05$) par DMRT.

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level ($P < 0.05$) by DMRT. / Les moyennes suivies par une lettre commune ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % ($P < 0,05$) par DMRT.

Table V. Lysis effect of biocontrol agents on sclerotia of *S. sclerotiorum*.Tableau V. Effet de lyse des agents de lutte biologique sur les sclérotés de *S. sclerotiorum*.

Biocontrol agent	Ranks	Means of lysed sclerotia (No.)
Agent de lutte biologique	Classements	Moyennes des sclérotés lysés (Nbre)
<i>T. pseudokoningii</i> (TP-1)	3	16.0 ^a
<i>T. harzianum</i> (TH-1)	2	18.0 ^a
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	3	16.0 ^a
<i>T. longibrachiatum</i>	4	15.3 ^a
<i>T. harzianum</i> (TH-3)	2	18.0 ^a
<i>T. harzianum</i> (TH-4)	1	19.0 ^a

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level ($P < 0.05$) by DMRT.

Les moyennes suivies par une lettre commune ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % ($P < 0,05$) par DMRT.

Study on lysis effect of biocontrol agent of *S. sclerotiorum* in vitro:

Though the means of lysed sclerotia were not significantly different at 5% level, "Parnian"(TH-3) isolate of *T. harzianum* was set at the first level compared to the others (Table V).

Trichoderma spp. are important biological agents for biocontrolling of many plant pathogens. As the fungicide application is very dangerous because of the silkworm susceptibility to poisons, using biocontrol is the most suitable method for controlling mulberry fungal diseases. So it was necessary to recognize the local isolates of antagonists which were more suitable to environmental conditions which was the most important purpose in this investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mr.S.M.Mirzaghafour general director of Iran Silkworm Rearing Co. for supporting this research. Furthermore authors also wish to thank Mr.A.Sepehrifar, Miss. M. Safari and Mrs. F. Bakhshizad for their help to this research.

REFERENCES

- AMIRSADEGHI S., SHARIFI-TEHRANI A., HEDJAROUDE GH.A., OKHOVAT M. & ROUHANI H. 1993. Study on antagonistic effects of *Trichoderma* isolates on *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sclerotinia disease of eggplant. Iranian Journal of Plant Pathology 1994. Vol.30, No. 1-4: 202-205.
- ANONYM. 1953. Plant Disease, the Yearbook of Agriculture. United State Department of Agriculture. 417-418.
- AVILA DE MORENO C. & GUTERREZ DE GERARDINO A. 1992. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on lettuce (*Lettuca sativa* L.). Review of plant pathology 1995. Vol. 74, No. 6.
- BAZGIR E. 1991. A study on antagonistic effect of *Trichoderma* on *Rhizoctonia solani* Kuehn, the causal agent of bean damping-off and seed rot. M.S. Thesis. Dept. of Plant Protection. Coll. Of Agr. University of Tehran, Karadj, Iran.197.

- BURGESS D. R. & HEPWORTH G. 1996. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) in sunflower by seed treatment with *Gliocladium virens*. Plant pathology 45: 583 - 592 .
- DAVET P. 1979. Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dar. Le sol. Ann. Phytopathol. 11: 529-523.
- LUO K., REN X. J., ZHOU O. Y., VHEN Y. & YANG Y. 1990. Study of parasitic fungi on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Rev. Plant Pathology 68:14.
- MIRHOSSEINI MOGHADAM S. A. & IZADYAR M. 1986. Twig die-back of mulberry trees. 8th Iranian Plant Protection Congress , Isfahan.
- MIRHOSSEINI MOGHADA S.A. & VISHKAEI SEDDIGH S. 1995. Controlling of twig die-back of mulberry. First National Meeting of Silk, Rasht.
- STREETS R.B. 1997. The Diagnosis of Plant Diseases. University of Arizona Press.
- YAZDI SAMADI B., REZAEI A., VALIZADE M. 1997. Statistical designs in the agricultural researches. (first edit) Tehran University press.

ETUDE SUR L'EFFET ANTAGONISTE DE *TRICHODERMA* SPP. DE LA PROVINCE DE GUILAN (IRAN) SUR *SCLEROTINIA SCLEROTIUM*, L'AGENT RESPONSABLE DU DOGARE DU BOURGEON ET DE LA BRINDILLE CHEZ LES MURIERS

A. MERAT¹, S. A. M. MOGHADAM² & H. ROUHANI³

1. Research Dep., Iran Silkworm Rearing Co., Rasht, I. R. Iran.

2. Tea Research Institute, Lahidjan, Iran.

3. Plant Protection Dept. Bu-Ali Sina Univ., Hamadan, Iran.

Dans cette étude, on a étudié les effets antagonistes de *Trichoderma koningii*, *T. hamatum*, *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, *T. saturnisporum*, *T. longibrachiatum* et *T. Harzianum* isolés dans les mûraies de la province de Guilan (Iran) sur l'agent responsable du dogare du bourgeon et des brindilles chez le mûrier : *Sclerotinia sclerotiorum*. Dans ce but, nous avons étudié la capacité de colonisation, les propriétés de lyse et la capacité d'inhibition des métabolites volatiles au moyen des méthodes de la culture double et des méthodes des boîtes de petri superposées. Les résultats *in vitro* sont les suivants :

Avec la méthode de la culture double, *T. harzianum* isolé à Shalman (TH-2), *T. harzianum* isolé à Pasikhan, *T. harzianum* isolé à Parnian (TH-4) suppriment la croissance mycéliale de *S. sclerotiorum* et le parasitent au bout de 48 heures.

Avec la méthode des boîtes de petri superposées au bout d'une semaine, *T. pseudokoningii* isolé à Chophol (TP-1), *T. harzianum* isolé à Parnian (TH-4) sont les plus efficaces pour inhiber la croissance de *S. sclerotiorum*.

T. harzianum isolé à Parnian est le plus efficace pour la destruction et la lyse de *S. sclerotiorum* au bout de 40 jours.

INTRODUCTION

Sclerotinia sclerotiorum, l'agent responsable du dogare de la brindille du mûrier est un champignon polyphage qui provoque des dégâts chez de nombreuses cultures horticoles et arbres fruitiers. Il provoque aussi des dégâts chez les plantes ornementales et les légumes. Christoff a rapporté la présence de *S. sclerotiorum* sur le mûrier pour la première fois en Bulgarie en 1932 (Anonyme, 1953). Mirhosseini Moghadam et coll., ont trouvé le champignon sur des mûriers en Iran en 1986. Ils ont aussi étudié sa biologie. Ils ont montré que les dégâts chez deux variétés japonaises Ichinose et Shin-Ichinose sont supérieurs à 50 % en juin. Récemment, on a remarqué qu'il provoque des dégâts chez les variétés de mûrier locales. Selon les références, on peut utiliser des champignons antagonistes avec succès pour lutter biologiquement contre des champignons du sol importants tels que *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp. et *Rhizoctonia* spp. Certaines espèces de *Trichoderma* s'avèrent efficaces sur *S. sclerotiorum* chez les aubergines. Le champignon antagoniste recouvre la surface d'une colonie de *sclerotium* en peu de temps et empêche la formation de sclérotés. Les métabolites non-volatiles

inhibent la germination des sclérotés et aussi la croissance mycéliale (Amirsadeghi et coll., 1993). Bazgir a étudié la colonisation *in vitro* des mycelia et des sclérotés de *Rhizoctonia solani*, l'agent de la pourriture de la graine, de la pourriture de la racine et de la fonte des semis chez de nombreuses plantes comme le haricot, grâce à certains isolats de *Trichoderma*. Dans cette étude, certains isolats qui sont des mycoparasites puissants, luttent contre la maladie en produisant des métabolites non-volatiles et en pénétrant dans les hyphes du pathogène. Parfois, ils fragmentent les mycélium et inhibent la croissance mycéliale. Luo et coll., (1990) ont montré que 7 souches de *T. viride* ont une efficacité très élevée (plus de 90 %) sur la lyse des sclérotés de *S. sclerotiorum* lorsqu'on mélange 100 spores à un gramme de sol. La vaporisation d'une suspension de spores de *T. harzianum* ($1,8 \times 10^6$ spores pour chaque plant) est très efficace pour lutter contre la pourriture sclérotiniale de la laitue (Avila de Moreno, C. & Guterrez de Gerardino ; 1992). Le traitement de la graine de tournesol avec *Gliocladium virens* est efficace pour lutter contre la maladie (Burgess & Hepworth, 1966). On a introduit de nombreux types de champignons antagonistes commerciaux sur le marché sous forme de granulés ou de poudre. Comme c'est la première étude sur la lutte biologique contre le dogare sclérotinial du mûrier en Iran, il est nécessaire de reconnaître les isolats locaux des antagonistes qui sont plus sensibles à l'environnement et c'est l'objectif le plus important de cette recherche. Cette étude conduit à une conclusion satisfaisante *in vitro*. Par ailleurs, c'est la première fois que l'on reconnaît *Trichoderma* spp. dans les mûraies de la province de Guilan.

MATERIELS ET METHODES

Isolement de l'agent biologique dans le sol :

On recueille les échantillons de sol dans des mûraies dans différentes zones de la province de Guilan. On irrigue le sol recueilli un jour sur deux pendant une semaine jusqu'à ce que les mycelium et les spores existantes soient activées. Après la préparation, on ajoute la suspension de sol dans des boîtes de petri contenant de l'agar liquide. On les mélange l'un à l'autre en parts égales et on fait coaguler les milieux dans des conditions de laboratoire. Pour l'isolement de l'agent antagoniste fongique, on utilise du milieu de Davet. On découpe un tampon de 10 mm d'agar liquide et de suspension de sol préparée avec un emporte-pièce et on le place au centre des boîtes de Petri contenant du milieu de Davet. On cultive séparément chaque échantillon de sol dans 10 boîtes de petri. On incube les boîtes de Petri à 25° C pendant 48 heures à l'obscurité. Puis on les incube à la lumière naturelle à 25° C. Après la croissance des colonies de champignons et la sporulation, on les "purifie" par des monohyphes et des monospores (Streets, 1997). On maintient les cultures pures dans un milieu agar de dextrose de pomme de terre (PDA) (Streets, 1997). Les vingt isolats obtenus à partir du sol appartiennent à 7 espèces de *Trichoderma*.

Reproduction des sclérotés du pathogène :

Dans ce but, on fait tremper des graines de millet. On met les graines dans un Erlenmeyer de 1000 ml, on ajoute de l'eau distillée jusqu'à ce que le volume atteigne 600 ml. Après la stérilisation à 120° C sous 1,5 atmosphère, on inocule un tampon de 10 mm d'une culture de 72 heures de *S. sclerotiorum* dans l'Erlenmeyer. On l'incube à 18-20° C pendant 25 jours. Après la formation des sclérotés, on les stérilise avec le sublimat pendant 1 minute. Après les avoir lavés avec de l'eau distillée et les avoir séchés dans du papier, on les recueille et on les incube au réfrigérateur.

Etude de la vitesse de croissance, de la colonisation et de la sporulation de l'agent antagoniste :

Pour choisir des isolats à croissance rapide aux spores abondantes, on cultive l'agent biologique sur de l'agar de dextrose de pomme de terre. Au bout de 72 heures, on place un disque de 8 mm de chaque isolat au centre des boîtes de Petri contenant du milieu PDA. On incube les boîtes de Petri à

25° C. On répète chaque traitement trois fois. On mesure la colonisation et la sporulation après 48 et 72 heures.

Etude sur l'interaction entre l'agent biologique et *S. sclerotiorum* au moyen de la méthode de culture double :

On cultive chaque agent de lutte biologique avec le pathogène dans une boîte de Petri. On place les tampons du pathogène découpés avec un emporte pièce dans une boîte de Petri à 5 cm de distance l'un de l'autre. Pour le traitement témoin, on utilise un disque de milieu PDA sans mycélium antagonistes. Après incubation à 25° C pendant 48 heures on étudie les caractéristiques des antagonistes.

Etude sur les métabolites volatiles de l'agent de lutte biologique choisi par rapport à la croissance mycéliale de *S. sclerotiorum* au moyen de la méthode des boîtes de Petri superposées :

On cultive séparément le tampon des jeunes mycélium de *S. sclerotiorum* et aussi un mycélium de quatre jours de *Trichoderma* et on place les boîtes de Petri les unes au-dessus des autres. On les ferme avec du parafilm. On incube les boîtes de Petri superposables à 25 ° C et on mesure le pourcentage d'inhibition de la croissance au bout de 72 heures et une semaine d'après la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Diamètre de la croissance sclérotiniale dans les boîtes de Petri témoins} - \text{Diamètre de la croissance sclérotiniale affectée par les métabolites volatiles}}{\text{Diamètre de la croissance sclérotiniale dans les boîtes de Petri témoins}}$$

Etude sur la capacité de lyse *in vitro* par l'agent de lutte biologique sur *S. sclerotiorum* :

On cultive les agents de lutte biologique sur du milieu PDA. Quand les champignons antagonistes recouvrent complètement la surface des plaques, on place 20 sclérotés de *S. sclerotiorum* dans chaque boîte de Petri. Pour chaque champignon antagoniste, on prend trois répétitions en considération. Pour le traitement témoin, on place les sclérotés sur un milieu PDA sans antagoniste. On incube les boîtes de Petri à 25° C pendant 40 jours. On étudie la lyse avec une aiguille en éclairant la surface des sclérotés. On compte les sclérotés lysés et on compare la capacité de lyse entre les isolats de *Trichoderma*.

Toutes les données sont déterminées et analysées avec le logiciel de statistiques IRRISTAT*. Finalement, les données sont comparées au moyen du test de Duncan (Yazdi Samadi et coll., 1997).

RESULTATS ET DISCUSSION

Choix des meilleurs isolats du point de vue de la vitesse de croissance des colonies et de la sporulation :

On choisit 9 isolats sur 20 dans une sélection primaire. On étudie la croissance de la colonie et la sporulation des isolats en mesurant la taille de la colonie et la sporulation après 48 et 72 heures et on choisit 6 isolats appartenant à trois espèces de *Trichoderma*. L'isolat de *T. pseudokoningii* de "Soltanmoradi", l'isolat de *T. pseudokoningii* de "Chophol" (TP-2), l'isolat de *T. harzianum* de "Shalman" (TH-2), l'isolat de *T. harzianum* de "Pasikhan" (TH-3), l'isolat de *T. harzianum* de "Parnian" (TH-4) et l'isolat de *T. longibrachiatum* de "Pasikhan" ont la vitesse de croissance la plus élevée et la sporulation la plus importante par rapport aux autres (Tableaux I & II).

* International Rice Research Institute STAT.

Etude sur l'interaction entre l'agent biologique et *S. sclerotiorum* au moyen de la culture double :

D'après les résultats de la culture double chez les espèces de *Trichoderma* et de *S. sclerotiorum*, l'isolat de *T. harzianum* de "Shalman" (TH-2), l'isolat de *T. harzianum* de "Pasikhan" (TH-3) et l'isolat de *T. harzianum* de "Parnian" (TH-4) pourraient coloniser et parasiter les mycelium des sclérotés. Ils empêchent aussi la croissance mycéliale sur le milieu PDA (Tableau III).

Etude sur les métabolites volatiles de l'agent de lutte biologique par rapport à la croissance mycéliale de *S. sclerotiorum* au moyen de la méthode des boîtes de Petri superposées :

L'étude des effets des métabolites volatiles des champignons antagonistes sur le pathogène montre que l'isolat de *T. pseudokoningii* de "Chophol" (TP-2) et l'isolat de *T. harzianum* de "Parnian" (TH-4) ont le plus d'effet pour inhiber la croissance du pathogène au bout de 72 heures (Tableau IV).

Etude sur l'effet de lyse *in vitro* de l'agent de lutte biologique de *S. sclerotiorum* :

Bien que les moyennes du nombre de sclérotés lysés ne soient pas significativement différentes au seuil de 5 %, l'isolat de *T. harzianum* de "Parnian" (TH-3) se classe au premier rang par rapport aux autres (Tableau V).

Trichoderma spp. sont des agents biologiques importants pour lutter de manière biologique contre de nombreux pathogènes des plantes. Comme l'application de fongicides est très dangereuse en raison de la sensibilité des vers à soie aux poisons, l'utilisation d'agents biologiques est la méthode la plus adaptée pour lutter contre les maladies fongiques du mûrier. Il était donc nécessaire de reconnaître les isolats locaux des antagonistes les plus adaptés aux conditions environnementales, ce qui représentait l'objectif principal de cette étude.

A PROTOCOL FOR *IN VITRO* REGENERATION OF MULBERRY VARIETY - S54 THROUGH CALLUS PHASE

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

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

*In the present investigation, high frequency (83 %) of callus was induced from the cut ends of in vitro petiole explant derived through direct organogenesis of mulberry variety - S54 when cultured on LSBM fortified with 2,4-D (2.5 mg l^{-1}) when compared to low frequency (15%) of callus induction on LSBM fortified with NAA (1.0 mg l^{-1}) and after 21 days of culture, profuse light yellowish compact callus and moderate creamish white friable callus was observed respectively. After 15 days of subculture, best morphogenetic response (78%) with maximum number of shoot bud differentiation was observed from the light yellowish compact callus on LSBM fortified with BAP (3.0 mg l^{-1}) and 2,4-D (0.5 mg l^{-1}) when compared to the creamish white friable callus which revealed lowest response of 20% on LSBM fortified with BAP (1.0 mg l^{-1}) and NAA (0.5 mg l^{-1}). The well developed elongated, healthy, multiple shoots derived from light yellowish compact callus were subjected to *ex vitro* rooting technique to obtain a complete plantlet. The rooted plants were successfully transferred to the field. Statistical analysis revealed significant differences between and within the treatments with regard to fresh and dry weight of the calli. For the first time, a repeatable protocol has been developed for differentiation of complete plantlets from the petiole callus in mulberry variety - S54.*

Keywords : Mulberry, petiole, differentiation, multiple shoots, *ex vitro* rooting.

Abbreviations : LSBM - Linsmaier and Skoog's Basal Medium
BAP - 6-Benzyl Amino Purine
NAA - α -Naphthalene Acetic Acid
2,4-D - 2,4-Dichlorophenoxy Acetic acid

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* species), plays a significant role in the silk industry due to its foliage, which constitutes the chief food for the silkworm, *Bombyx mori* L. Mulberry improvement programs have been hampered due to long life cycle, heterozygosity, polyploidy, dioecy and extensive outbreeding (Kavyashree *et al.*, 2002). Moreover, in vegetatively propagated plants like mulberry it takes many years to evolve a clone with desirable economic and commercial traits through conventional hybridization techniques (Ravindran *et al.*, 1988; Kavyashree *et al.*, 2001). Further, mulberry is commonly propagated through cuttings and graftings, which pose difficulties to poor rooting.

In vitro propagation techniques in mulberry are confined to regeneration and micropropagation using different explants (Oka and Ohyama, 1974; Patel *et al.*, 1983; Ivanicka, 1987; Tewary and Subba Rao, 1990). At present, few reports are available on callus induction and shoot bud

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

differentiation in different mulberry varieties (Oshigane, 1989 ; Jain and Datta, 1992; Srinivasa *et al.*, 2001). However, reports on regeneration of plants by callus culture in the genus *Morus* has straggled. Further, repeatability of the *in vitro* protocols developed hitherto, is not assured (Tewary *et al.*, 1996). In this paper, for the first time a repeatable protocol has been reported for the induction and differentiation of complete plantlets through callus phase using *in vitro* non-embryogenic vegetative propagule petiole explant of mulberry variety S54.

MATERIAL AND METHODS

Mulberry variety – S54 is a beneficial mutant evolved from Berhampore local through mutation breeding. This variety belongs to *Morus indica* L. of class *Dicotyledon*, sub-class *Archichlamydae*, order *Urticales*, family *Moraceae* and genus *Morus* grown upto 4-6 mts as a tree, but commercially grown in the form of a bush.

The non-embryogenic vegetative propagule petiole measuring about 0.8 – 1.0 cm was excised from *in vitro* raised plants obtained through direct organogenesis using *in vivo* apical bud of mulberry variety - S54. The aseptic petiole explants were cultured on LSBM fortified with 2,4-D and NAA separately ranging from 1.0 mg l⁻¹ - 3.5 mg l⁻¹ to induce callus. The potentiality of petiole for callus induction was studied by scoring the cultures at the end of 12 days. The frequency of callus induction was computed as the ratio of number of explants responding to that of total number of explants inoculated and was expressed in percentage (%). After 21 days of culture, the fresh and dry weight of two types of calli obtained on LSBM fortified with 2,4-D and NAA was recorded and expressed in grams (g). The data obtained in the present study were analysed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the variation between and within the treatments.

21 days old calli were subcultured on LSBM supplemented with different concentrations of BAP ranging from 1.0 mg l⁻¹ - 5.0 mg l⁻¹ and 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D and NAA to study their effect on organogenesis. The well developed multiple shoots were transferred to bottles containing horticultural grade soilrite-mix: - peat : perlite : vermiculate (1 : 1 : 1 v/v) fortified with half strength MS salts and NAA 1 mg l⁻¹ for *ex vitro* rooting. After 21 days, the multiple shoots with roots were transferred to pots containing tissue culture grade soilrite-mix: - peat : perlite (3 : 1 v/v) for profuse rooting and acclimatization. After 10 days, the acclimatized complete plantlets were transferred to field.

RESULTS

Callus induction:

In the present study, aseptic petiole explants (Fig. 1) callused at cut ends (Fig. 2) after 12 days of culture on LSBM in all the concentrations of auxins 2,4-D and NAA tried with varying frequency of response (15-83%). The high frequency of 83% callusing was observed on LSBM fortified with 2,4-D 2.5 mg l⁻¹ and the low frequency of 15 % callusing on LSBM fortified with NAA 1.0 mg l⁻¹ (Table I). After 21 days of culture, profuse light yellowish compact (Fig. 3) and moderate creamish white friable (Fig. 4) calli was observed on respective media.

Statistical analysis:

The statistical analysis of the data pertaining to the amount of calli revealed that there exists a highly significant difference between and within the treatments. The highest amount of light yellowish compact callus was observed on LSBM fortified with 2,4-D 2.5 mg l⁻¹ with fresh weight 1.69g and dry weight 0.30 g and moderate amount of creamish white friable callus was observed on LSBM fortified with NAA 3.0 mg l⁻¹ with fresh weight 1.38g and dry weight 0.15g (Table II).

Table I. Effect of different concentrations of auxins on induction of callus from aseptically explants of mulberry variety – S54 (*Morus indica* L.).**Tableau I. Effet de différentes concentrations d'auxines sur l'induction de cals à partir d'explants de pétiole aseptique de la variété de mûrier S54 (*Morus indica* L.).**

Basal Media	Type of auxin	Concentration (mg l ⁻¹)	Culture duration	Response (%)
<i>Milieu de base</i>	<i>Type d'auxine</i>		<i>Durée de la culture</i>	<i>Réponse (%)</i>
LS	2,4-D	1.0	12 days / 12 jours	31
LS	2,4-D	1.5	12 days / 12 jours	49
LS	2,4-D	2.0	12 days / 12 jours	67
LS	2,4-D	2.5	12 days / 12 jours	83
LS	2,4-D	3.0	12 days / 12 jours	77
LS	2,4-D	3.5	12 days / 12 jours	62
LS	NAA	1.0	12 days / 12 jours	15
LS	NAA	1.5	12 days / 12 jours	20
LS	NAA	2.0	12 days / 12 jours	26
LS	NAA	2.5	12 days / 12 jours	48
LS	NAA	3.0	12 days / 12 jours	47
LS	NAA	3.5	12 days / 12 jours	35

Differentiation of multiple shoots:

The 21 days old light yellowish compact callus revealed the best morphogenetic response of 78% with the differentiation of maximum number of shoot buds (4-5) on LSBM fortified with BAP 3.0 mg l⁻¹ and 2,4-D 0.5 mg l⁻¹ after 15 days of subculture. Further, the creamish white friable callus showed lowest response of 20% on LSBM fortified with BAP 1.0 mg l⁻¹ and NAA 0.5 mg l⁻¹. After 45 days of subculture, well developed elongated, healthy multiple shoots (8-10) (Fig. 5) were obtained from light yellowish compact callus on the same medium (Table III).

Ex vitro rooting:

It was observed in the present study that the *ex vitro* rooting technique using horticultural and tissue culture grade soilrite mix was the best potting mixture for rooting, hardening and simultaneous acclimatization of *in vitro* regenerants (Fig. 6).

DISCUSSION

In vitro non-embryogenic propagule petiole derived from direct regeneration of apical bud was chosen for retrieval of plants through callus phase. The advantage of using aseptically derived tissues is essential due to the fact that it is free of phenolic compounds, the accumulation of which inhibits organogenesis in the tree plants as described by Srinivasa *et al.*, (2001). This present investigation is in agreement with many researchers who have used explants derived from aseptic plants for clonal multiplication of woody plants (Neena Kumari and Pardha Saradhi, 1992; Arrebola *et al.*, 1997; Srivivasa *et al.*, 2001).

Table II. Effect of different concentrations of auxins on growth of callus from aseptic petiole explants of mulberry variety-S54 (*Morus indica* L.).

*Tableau II. Effet de différentes concentrations d'auxines sur la croissance du cal à partir d'explants de pétiole aseptique de la variété de mûrier S54 (*Morus indica* L.).*

Basal Media	Type of auxin	Conc. (mg l ⁻¹)	Culture duration	Fresh weight (g) $\bar{X} \pm \text{SD}$	Dry weight (g) $\bar{X} \pm \text{SD}$
<i>Milieu de base</i>	<i>Type d'auxine</i>		<i>Durée de culture</i>	<i>Poids frais (g)</i>	<i>Poids sec (g)</i>
LS	2,4-D	1.0	21 days / 21 jours	0.83 ± 0.13	0.06 ± 0.02
LS	2,4-D	1.5	21 days / 21 jours	0.99 ± 0.14	0.09 ± 0.01
LS	2,4-D	2.0	21 days / 21 jours	1.42 ± 0.14	0.15 ± 0.01
LS	2,4-D	2.5	21 days / 21 jours	1.69 ± 0.14	0.30 ± 0.01
LS	2,4-D	3.0	21 days / 21 jours	1.60 ± 0.16	0.20 ± 0.01
LS	2,4-D	3.5	21 days / 21 jours	1.34 ± 0.16	0.11 ± 0.01
LS	NAA	1.0	21 days / 21 jours	0.54 ± 0.11	0.05 ± 0.01
LS	NAA	1.5	21 days / 21 jours	0.73 ± 0.12	0.06 ± 0.01
LS	NAA	2.0	21 days / 21 jours	0.81 ± 0.14	0.07 ± 0.01
LS	NAA	2.5	21 days / 21 jours	1.03 ± 0.16	0.09 ± 0.01
LS	NAA	3.0	21 days / 21 jours	1.38 ± 0.16	0.15 ± 0.01
LS	NAA	3.5	21 days / 21 jours	1.24 ± 0.12	0.10 ± 0.01
Test F (%)				68.15**	377.25**

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

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

In the present study, 2,4-D 2.5 mg l⁻¹ was found to be the best auxin in effectively inducing callus (83%) when compared to NAA (15%). This observation corroborates the findings of Oka and Ohshima (1973), Ogurtsov *et al.*, (1986) and Sahoo *et al.*, (1997). Further, they have reported callus induction on Murashige and Skoog's Basal Medium (MSBM) fortified with 2,4-D. Hence, the present findings are in contrast with their observations in respect of basal medium. It was found that the statistical analysis of the data pertaining to the fresh weight and dry weight of the calli revealed significant differences between and within the treatments.

Of the two types of calli obtained in the present study, the best morphogenetic response of 78% with induction of organogenesis and subsequent development of plants after one passage of subculture was observed on high concentration of BAP 3 mg l⁻¹ and low concentration of 2,4-D 0.5 mg l⁻¹ from light yellowish compact callus when compared to 20% of lowest response in NAA derived creamish white friable callus. This may be due to synergistic effect of auxin and cytokinin ratio within a range of concentration as described by Skoog and Miller (1957).

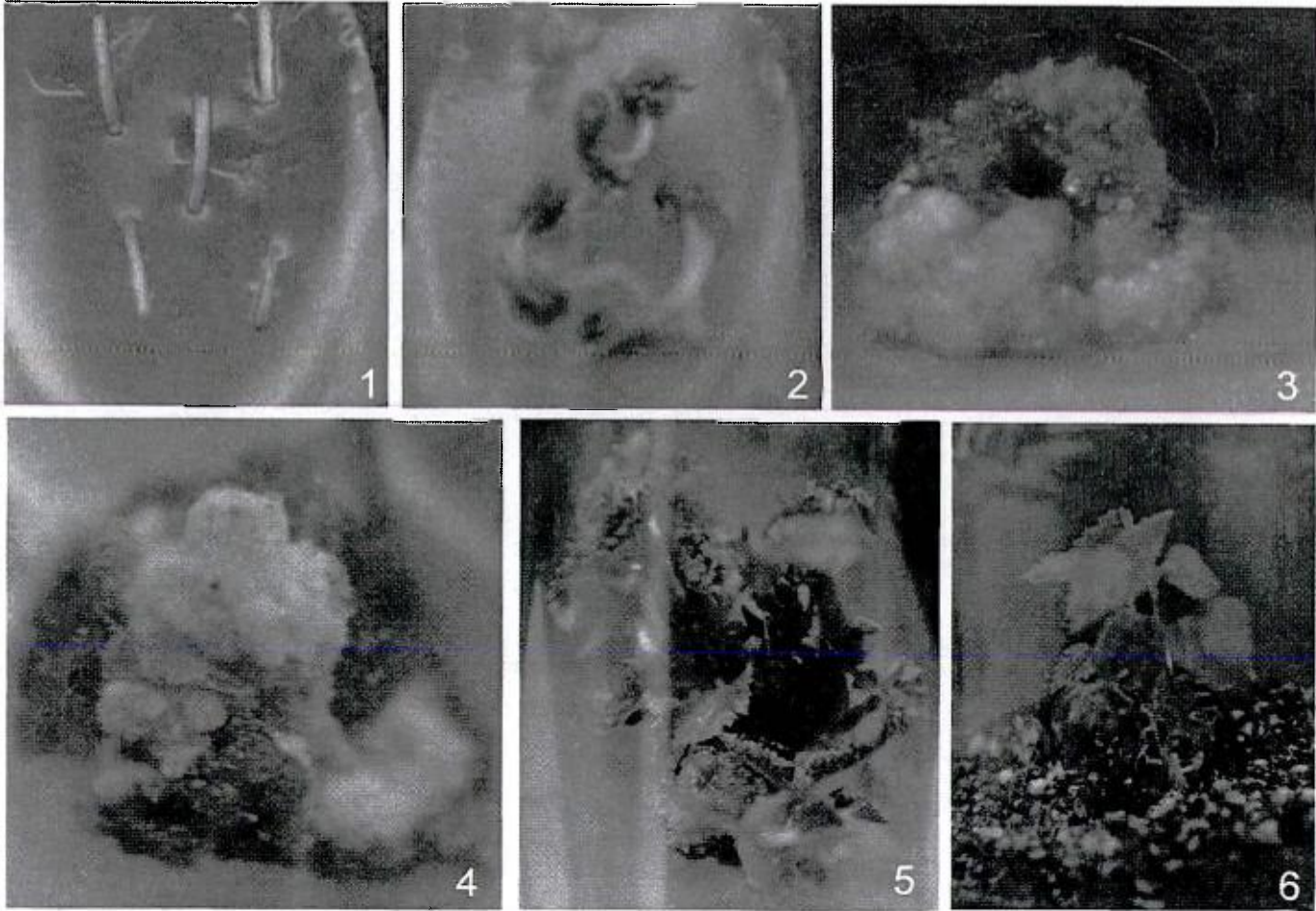


Fig. 1. Petiole explant at culture. / *Fig. 1. Explant de pétiole en culture.* **Fig. 2.** Callusing of explant at cut ends. / *Fig. 2. Formation de cals chez les explants aux extrémités.* **Fig. 3.** Light yellowish compact callus. / *Fig. 3. Cal compact jaune clair.* **Fig. 4.** Creamish white friable callus. / *Fig. 4. Cal friable blanc crèmeux.* **Fig 5.** Healthy elongated multiple shoots. / *Fig. 5. Pousses multiples saines allongées.* **Fig. 6.** Ex vitro rooting of multiple shoots. / *Fig. 6. Racinement ex vitro des pousses multiples.*

Table III. Effect of different concentrations of cytokinin and auxins on regeneration of petiole callus of mulberry variety- S₅₄ (*Morus indica* L.).**Tableau III. Effet des différentes concentrations de cytokinine et d'auxines sur la régénération du cal de pétiole de la variété de mûrier S₅₄ (*Morus indica* L.).**

Basal Media	Growth regulators (mg ⁻¹)		Petiole	
	BAP	2,4-D	Response (%)	No. of shoots / culture
Milieu de base	Régulateurs de croissance (mg ⁻¹)		Pétiole	
	BAP	2,4-D	Réponse (%)	Nbre de pousses / culture
LS	1	0.5	46	3-5
LS	2	0.5	61	5-6
LS	3	0.5	78	8-10
LS	4	0.5	73	6-8
LS	5	0.5	68	6-7
	BAP	NAA		
LS	1	0.5	20	3-4
LS	2	0.5	29	3-5
LS	3	0.5	38	4-5
LS	4	0.5	50	5-7
LS	5	0.5	44	4-6

It was found in the present study, that well developed multiple shoots efficiently rooted, hardened and acclimatized in *ex vitro* conditions, which were successfully transferred to the field. This coincides with the findings of Katase (1994). This technique eliminates a step of *in vitro* rooting thereby reducing the overall cost of micropropagated plants.

The above study thus demonstrates a repeatable protocol for plant regeneration from petiole derived callus. The results of this study will go a long way in genetic manipulation and amelioration in mulberry.

ACKNOWLEDGEMENT

Financial assistance provided by Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), New Delhi, to one of the authors Kavyashree R. is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- ARREBOLA M. L., SOCORRO O. & VERPOORUTE R. (1997) Micropropagation of *Isoplexis canarieasis* (L.) G. Don. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49 : 117-119.
- IVANICKA J. (1987) *In vitro* micropropagation of mulberry *Morus nigra* L. Scientia Horticulturae 32: 33-39.
- JAIN A. K. & DATTA R. K. (1992) Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koidz.): Factors influencing morphogenetic potential in callus cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 29 : 43-50.
- KATASE M. (1994) Root initiation and acclimatization of mulberry shoots by the *ex vitro* rooting method with mist treatment. J. Seric. Sci. Jpn. 63(2) : 293-298.
- KAVYASHREE R., GAYATRI M. C. & REVANASIDDAIAH H. M. (2001) A repeatable protocol for the production of gynogenic haploid plants in mulberry. Sericologia, 41(3): 517-521.
- KAVYASHREE R., GAYATRI M. C. & REVANASIDDAIAH H. M. (2002) Induction of haploids through ovule culture in mulberry variety - S54. Sericologia, 42(4) : 551-559.
- NEENA KUMARI & PARDHA SARADHI P. (1992) Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgave* L. Plant Cell Rep. 11: 476-479.
- OGURTSOV K. S., ATABEKOVA K. S., KHALMIRZAEV M. M. & MADYAROV S. H. B. (1986) Culturing the meristems of young mulberry leaves on an artificial nutrient medium. Shelk 1 : 3.
- OKA S. & OHYAMA K. (1973) Induction of callus and effects of constituents of medium on callus formation of mulberry tree. J. Seric. Sci. Jpn 42(4): 317-324.
- OKA S. & OHYAMA K. (1974) Studies on *in vitro* culture of excised bud in mulberry tree. I. Effect of growth substances on the development of shoots and organ formation from winter buds. J. Seric. Sci. Jpn. 43(3): 230-235.
- OSHIGANE K. (1989) Studies on formation of adventitious bud and growth of plantlet in the hypocotyl callus of mulberry. J. Fac. Text. Sci. Tech. Sinshu Univ. E Agri. Seric. 107: 53-54.
- PATEL G. K., BAPAT V. A. & RAO P. S. (1983) *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*. Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. Zetschrift-fuer-Pflanzenphysiologie (Germany, F. R.) 111(5): 465-468.
- RAVINDRAN S., DANDIN S. B. & JAIN A. K. (1988) Application of Plant cell, tissue and organ culture in mulberry improvement programmes. Indian Silk (Dec. Ed.): 37-39.
- SAHOO Y., PATTNAIK S. K. & CHAND P. K. (1997) Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. Scientia Horticulturae 69(1-2): 85-98.
- SKOOG F. & MILLER C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. The biological action of growth substances. Sym. Soc. Exp. Biol. Academic Press, New York, 11: 118-131.
- SRINIVASA M. N., REVANASIDDAIAH H. M., GAYATRI M. C. & KAVYASHREE R. (2001). Indirect organogenesis through stem callus in mulberry variety Berhampore local. Sericologia 41(1): 101-104.
- TEWARY P. K., RAGHUNATH M. K., VENKATESWARLU M. & SARKAR A. (1996) Genotypic differences in response to *in vitro* shoot development of mulberry (*Morus* spp.). Seric. 35(2): 104-106.
- TEWARY P. K. & SUBBA RAO G. (1990) Multiple shoot formation through shoot apex culture of mulberry. Ind. J. Forestry 13: 109-111.

UN PROTOCOLE POUR LA REGENERATION *IN VITRO* DE LA VARIETE DE MURIER S54 AU COURS DE LA PHASE DU CAL

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

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

Dans cette étude, on a induit une fréquence élevée (83 %) de cals à partir des extrémités coupées d'explant de pétiole *in vitro* obtenu par une organogenèse directe de la variété de mûrier S54 quand on la cultive sur du LSBM fortifié avec du 2,4-D ($2,5 \text{ mg l}^{-1}$) par comparaison à la faible fréquence d'induction de cals (15 %) obtenue sur du LSBM fortifié avec du NAA (1 mg l^{-1}) et au bout de 21 jours de culture on observe respectivement un cal compact jaune clair et abondant et un cal friable blanc crémeux modéré. Après 15 jours de sous-culture, on obtient la meilleure réponse morphogénétique (78 %) avec un nombre maximum de différenciation de bourgeons de pousses à partir du cal compact jaune clair sur du LSBM fortifié avec du BAP (3 mg l^{-1}) et du 2,4-D ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) par comparaison au cal friable blanc crémeux qui donne la réponse la plus faible de 20 % sur du LSBM fortifié avec du BAP (1 mg l^{-1}) et du NAA ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$). Les pousses multiples, saines, allongées et bien développées dérivées du cal compact jaune clair sont soumises à une technique de racinement *ex vitro* pour obtenir un plant complet. Les plants racinés sont transférés avec succès sur le terrain. L'analyse statistique révèle des différences significatives entre et à l'intérieur des traitements pour le poids frais et sec des cals. Nous avons mis au point pour la première fois un protocole reproductible pour la différenciation de plants complets à partir du cal de pétiole chez la variété de mûrier S54.

Abréviations :

LSBM	Milieu de base de Linsmaier et Skoog
BAP	Amino purine 6-Benzile
NAA	Acide naphthalène- α acétique
2,4-D	Acide 2,4-Dichlorophenoxy acétique

INTRODUCTION

Le mûrier (espèce *Morus*) joue un rôle significatif dans l'industrie de la soie en raison de son feuillage, qui constitue la nourriture principale du ver à soie, *Bombyx mori* L. Les programmes d'amélioration du mûrier ont été entravés à cause de la longueur de son cycle de vie, de son hétérozygotie, de sa polyploidie, de sa dioécie, et d'un *outbreeding* important (Kavyashree et coll., 2002). De plus, chez les plants multipliés végétativement comme le mûrier, avec les techniques d'hybridation conventionnelles il faut beaucoup d'années pour mettre au point un clone aux caractéristiques commerciales et économiques désirées (Ravindran et coll., 1988 ; Kavyashree et coll.,

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

2001). Par ailleurs, le mûrier est couramment multiplié par boutures et greffes, qui posent des difficultés à cause de leur mauvais racinement.

Les techniques de multiplication *in vitro* sont limitées à la régénération et à la multiplication de différents explants (Oka et Ohyama, 1974 ; Patel et coll., 1983 ; Ivanicka, 1987 ; Tewary et Subba Rao, 1990). A présent, il existe quelques rapports sur l'induction de cal et la différenciation de bourgeons de pousses chez différentes variétés de mûrier (Oshigane, 1989 ; Jain et Datta, 1992 ; Srinivasa et coll., 2001). Cependant, les rapports sur la régénération des plantes par la culture des cals chez le genre *Morus* sont éparés. De plus, la répétition des protocoles *in vitro* mis au point jusqu'à présent n'est pas assurée (Tewary et coll., 1996). Dans cet article, nous présentons pour la première fois un protocole reproductible pour l'induction et la différenciation de plants complets au cours de la phase du cal en utilisant un explant de propagule de pétiole non embryogène *in vitro* de la variété de mûrier S54.

MATERIELS ET METHODES

La variété de mûrier – S54 est un mutant bénéfique mis au point à partir de la variété Berhampore local par lignage de mutation. Cette variété appartient à *Morus indica* L. de la classe des Dicotyledons, sous-classe de *Archichlamydae*, ordre des *Urticales*, de la famille des *Moraceae* et du genre *Morus* poussant jusqu'à 4 à 6 mètres comme arbre mais cultivé commercialement sous forme de buisson.

On excise le pétiole non embryogène mesurant environ 0,8 à 1 cm en utilisant un bourgeon apical *in vivo* de la variété de mûrier S54 provenant de plants cultivés *in vitro* obtenus par organogenèse directe. On cultive séparément les explants de pétiole aseptiques sur du LSBM fortifié avec du 2,4-D ou du NAA entre 1 mg l^{-1} et $3,5 \text{ mg l}^{-1}$ pour induire le cal. On étudie la potentialité d'induction du cal à partir du pétiole en analysant les cultures au bout de 12 jours. On calcule la fréquence d'induction de cals d'après le rapport entre le nombre d'explants répondant et le nombre total d'explants inoculés et on l'exprime en pourcentage (%). Au bout de 21 jours de culture, on enregistre le poids frais et sec des deux types de cals obtenus sur du LSBM fortifié avec du 2,4-D et du NAA et on l'exprime en grammes (g). On analyse statistiquement les données obtenues dans cette étude grâce à l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) pour déterminer la variation entre et à l'intérieur des traitements.

On place les cals de 21 jours en sous-culture sur du LSBM supplémenté avec différentes concentrations de BAP comprises entre 1 mg l^{-1} et 5 mg l^{-1} et $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de 2,4-D et de NAA pour étudier leur effet sur l'organogenèse. On transfère les pousses multiples bien développées dans des bouteilles contenant un mélange pour l'horticulture : tourbe : perlite : vermiculat (1 : 1 : 1 v/v) fortifié avec des sels MS (à une concentration $\frac{1}{2}$) et 1 mg l^{-1} de NAA pour le racinement *ex vitro*. Au bout de 21 jours, on transfère les pousses multiples avec des racines dans des pots contenant un mélange de tourbe : perlite pour la culture des tissus (3 : 1 v/v) pour le racinement abondant et l'acclimatation. Au bout de 10 jours, on transfère les plants complets sur le terrain.

RESULTATS

Induction de cals :

Dans cette étude, les explants de pétiole aseptiques (Fig. 1) forment un cal au niveau des extrémités coupées (Fig. 2) au bout de 12 jours de culture sur du LSBM à toutes les concentrations d'auxines 2,4-D et NAA essayées avec une fréquence variée de réponse (15 – 83 %). On observe une fréquence élevée de formation de cals de 83 % sur du LSBM fortifié avec $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ de 2,4-D et une faible fréquence de 15 % de formation de cals sur du LSBM fortifié avec 1 mg l^{-1} de NAA (Tableau I). Au bout de 21 jours de culture, on observe des cals abondants jaune clair compacts (Fig. 3) et blanc crémeux friables modérés (Fig. 4) sur les milieux respectifs.

Analyse statistique :

L'analyse statistique des données concernant la quantité de cal révèle qu'il existe une différence très significative entre et à l'intérieur des traitements. On observe la quantité la plus élevée de cal compact jaune clair sur du LSBM fortifié avec $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ de 2,4-D avec un poids frais de $1,69 \text{ g}$ et un poids sec de $0,30 \text{ g}$ et une quantité modérée de cal friable blanc crémeux sur du LSBM fortifié avec 3 mg l^{-1} de NAA au poids frais de $1,38 \text{ g}$ et au poids sec de $0,15 \text{ g}$ (Tableau II).

Différenciation des pousses multiples :

Le cal compact jaune clair de 21 jours donne la meilleure réponse morphogénétique de 78 % avec une différenciation maximum du nombre de bourgeons de pousses (4-5) sur du LSBM fortifié avec 3 mg l^{-1} de BAP et $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de 2,4-D au bout de 15 jours de sous-culture. Par ailleurs, le cal friable blanc crémeux donne la réponse la plus faible de 20 % sur du LSBM fortifié avec 1 mg l^{-1} de BAP et $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de NAA. Au bout de 45 jours de sous-culture, on obtient des pousses multiples saines, allongées bien développées (8-10) (Fig. 5) à partir du cal compact jaune clair sur le même milieu (Tableau III).

Racinement *ex vitro* :

On observe dans cette étude que la technique de racinement *ex vitro* en utilisant un mélange de sol pour la culture des tissus et l'horticulture est le meilleur mélange de terre pour le racinement, le durcissement et l'acclimatation simultanés des régénérants *in vitro* (Fig. 6).

DISCUSSION

On a choisi le propagule du pétiole non embryogène obtenu *in vitro* à partir de la régénération directe du bourgeon apical pour l'obtention de plants au cours de la phase de formation du cal. L'avantage de l'utilisation de tissus dérivés de manière aseptique vient du fait qu'ils sont exempts de composés phénoliques, dont l'accumulation inhibe l'organogenèse chez les arbres comme l'ont décrit Srinivasa et coll., (2001). Nos résultats sont en accord avec ceux de nombreux chercheurs ayant utilisé des explants dérivés de plants aseptiques pour la multiplication clonale de plantes ligneuses (Neena Kumari et Pardha Saradhi, 1992 ; Arrebola et coll., 1997 ; Srinivasa et coll., 2001).

Dans cette étude, on constate que le 2,4-D à $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ est la meilleure auxine pour induire efficacement des cals (83 %) par comparaison au NAA (15 %). Cette observation corrobore les observations d'Oka et d'Ohayama (1973), d'Ogurtsov et coll., (1986) et de Sahoo et coll., (1997). De plus, ces auteurs ont rapporté l'induction de cals sur du milieu de base de Murashige et Skoog (MSBM) fortifié avec du 2,4-D. Ainsi, les observations de notre étude sont en contradiction avec leurs observations concernant le milieu de base. L'analyse des données pour le poids frais et le poids sec des cals révèle des différences significatives entre et à l'intérieur des traitements.

Des deux types de cals obtenus dans cette étude, on observe la meilleure réponse morphogénétique de 78 % avec l'induction d'une organogenèse et le développement consécutif des plants après les avoir placés en sous-culture sur une concentration élevée de 3 mg l^{-1} de BAP et une faible concentration de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de 2,4-D à partir du cal compact jaune clair. Par comparaison la réponse est plus faible (20 %) avec le cal friable blanc crémeux dérivé du NAA. Comme l'ont décrit Skoog et Miller (1957), cela pourrait être dû à l'effet synergique entre l'auxine et la cytokinine dans la fourchette de concentration.

Dans cette étude, on constate que les pousses multiples bien développées racinent, durcissent et s'acclimatent efficacement dans des conditions *ex vitro* et sont transférées avec succès sur le terrain. Cela coïncide avec les observations de Katase (1994). Cette technique élimine une étape du racinement *in vitro*, ce qui diminue le coût général de la micro-multiplication des plants.

L'étude ci-dessus présente donc un protocole reproductible pour la régénération de plants à partir de cals dérivés du pétiole. Les résultats de cette étude seront très utiles pour la manipulation génétique et l'amélioration du mûrier.

IMPACT OF RUST DISEASE ON THE MINERAL NUTRITION OF MULBERRY PLANTS

M. P. SHREE, R. ANURADHA & V. NAGAVENI

Department of Studies in Sericulture, Bangalore University, Jnana Bharathi Campus,
Bangalore – 560056, India.

*An attempt was made to find out the impact of rust disease (caused by **Peridiopsora mori**) on the mineral nutrition of eleven indigenous (C₆, C₁₀, C₁₄, DD, Hakkikalu, M₅, Mysore local, S₁, S₁₃, S₃₀, S₃₆) and three exotic (Kosen, KNG, English black) mulberry varieties. Ten elements were analysed [macro-nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, sulphur, micro-zinc, iron, copper and manganese]. In the indigenous varieties, all the elements showed either increase or decrease in their content. But in C₁₀, S₁ and S₃₀, there was no change in the sulphur content due to rust infection. In the exotic varieties, there was a reduction in all the elemental contents, except English black which showed an increase in iron and sulphur contents; while sulphur content was unaltered in Kosen. In general, there was a varietal variation in the elemental composition of rust affected mulberry leaves.*

Keywords: Mineral nutrition, mulberry varieties, rust disease.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) is the basic and the only satisfactory food material for silkworms (*Bombyx mori* L.) as their growth and development are influenced to a greater extent by the nutritional quality of leaf. One of the major constraints for the success of mulberry crop is the outbreak of disease(s). All the nutritional elements are known to vary under pathogenesis in other crops, whereas in mulberry not much is known about them. Although there is some amount of work done on the different aspect of mulberry diseases, information available on the altered nutrient contents due to diseases is very meagre. Rust disease of mulberry is caused by a biotroph fungus i. e. *Peridiopsora mori* (Barclay) [= *Cerotelium fici* (Cast.) = *Aecidium mori* (Sydow and Butler) Barclay]. As the pathogen is an obligate parasite (i. e., it can survive and live only on the live tissues of the host), it invades the host tissues in a very “subtle” and “gentle” manner, so that the host is not killed quickly. The rust disease is usually seen on coarser leaves. So, any alteration in their nutritional quality will affect the growth and development of late age silkworms. Keeping this in view, the present investigation was taken up to find out the impact of rust disease on the mineral nutrition of mulberry plants.

MATERIALS AND METHODS

Rust affected and healthy leaves of eleven indigenous (C₆, C₁₀, C₁₄, Dehradun (DD), Hakkikalu, M₅, Mysore local, S₁, S₁₃, S₃₀, S₃₆) and three exotic [Kosen, Kairyonezumigaeshi (KNG) and English black (EB)] mulberry varieties were collected from Germplasm banks – Jnanabharathi Campus, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute (KSSR&DI), Thalaghattapura, Bangalore and Tippu Silkfarm, Sericulture Training School, Channapatna. The leaf samples were washed, dried, powdered and later used for analysing the total nitrogen and mineral contents. Total

nitrogen was determined by Kjeldahl method (Bhargava and Raghupathi, 1993). For mineral analysis, 1 gram of dried powdered leaf samples were acid digested using 9:4 mixture of nitric acid and perchloric acid. The digest was then cooled and filtered. The aliquots were taken from this solution and mineral nutrients phosphorus and sulphur (Chemito UV 2000 Spectrophotometer), potassium (Elico CL-360 Flame photometer), calcium, magnesium, copper, zinc, manganese and iron (Atomic absorption spectrophotometer) were estimated. The results were statistically analysed by applying Student's t-test.

RESULTS AND DISCUSSION

From Table I, it is clear that the **Nitrogen (N)** content (%) was decreased in the leaves of all the 14 mulberry (indigenous as well as exotic) varieties studied. Among the indigenous varieties (C series), decrease in the N content was more in C₁₀ when compared to others. There was a drastic decrease in S₃₆ compared to S₁, S₁₃ and S₃₀, compared to Mysore local, a slight decrease was noticed in M₅ variety. Reduction in the N content of DD and Hakkikalu varieties was non-significant. In the exotic varieties, highly significant decrease was noticed in EB compared to Kosen and KNG. Decrease in the N content of KNG variety was non-significant. The quality of mulberry leaf is dependent on its N content (Shankar, 1997). Proteins are the most important constituents in living tissues (leaves) and account for a large proportion of the total N content. Mulberry leaf protein is the source for silkworms to biosynthesise silk which comprises of two proteins i. e., fibroin and sericin (Rangaswamy *et al.*, 1976). The primary target of invading pathogen is N, as it is required for structural differentiation (Mathur and Vidhyasekaran, 1978). A highly significant correlation was found between the N content in leaf and weight of silkworm body, cocoon and shell (Subbarayappa and Bongale, 1997). There are a number of reports to show both increase and decrease in the level of N following infection in various crops (Karande, 1984; Umesh Kumar and Shree, 1990; Chandramma and Shree, 1998; Anuradha, 2001).

Phosphorus (P) is an important major nutrient in mulberry plant. It has a close relation with the synthesis of proteins, metabolism of fat and carbohydrates, respiration, photosynthesis and other metabolic activities. There was a decrease, an increase as well as no change in the P content of rust affected mulberry leaves. Among the indigenous varieties, it was reduced in C₁₀, C₁₄, DD, M₅ and S₁ and increased in C₆, Hakkikalu, Mysore local and S₃₆ varieties. There was only a negligible and non-significant difference in the P content of S₁₃ and S₃₀ varieties. Among the exotic varieties, KNG showed a highly significant reduction when compared to EB; in Kosen there was no change. Deficiency of P affects the uptake of other element in mulberry leaves, which in turn hamper the growth, and economic characters of silkworm (Ito and Niminura, 1966; Chakrabarthi *et al.*, 1997).

In mulberry, **Potassium (K)** has a role in carbon assimilation, nitrogen metabolism, activates several kinds of enzymes and controls respiration. It also plays a significant role in high yield (productivity) and quality leaf. The quality of leaf directly reflects on the silkworm rearing. In silkworm body, the strong alkalinity of the gastric juice originates from K and sodium compounds present in the blood. The high alkaline condition of digestive fluid has a strong germicidal power against pathogens. K is a unique element which contributes for the growth of silkworm to a maximum extent. In addition, K has a stimulating effect on protein synthesis including silk protein in the silk glands and on the function of ovary (Shankar *et al.*, 1995). Indigenous mulberry varieties attacked by rust disease showed a significant increase (C₆, C₁₄, DD and S₃₀ varieties) and decrease (C₁₀, Mysore local, S₁, S₁₃ and S₃₆ varieties), while Hakkikalu and M₅ varieties showed no significant change. However, the exotic varieties recorded a highly significant reduction. Many workers have reported decrease in the K content due to infection (Jaglan and Sindhan, 1988; Nagaraja and Umesh Kumar, 1988). While some workers (Mogle and Mayee, 1981) have reported an increase.

Table I. Changes in the mineral (macro elements) contents (%) of diseased (rust) mulberry leaves.*Tableau I. Changements de la teneur minérale (macro éléments) (%) des feuilles de mûrier malades (rouille).*

Mulberry Varieties	Nitrogen <i>Azote</i>		Phosphorus <i>Phosphore</i>		Potassium		Calcium		Magnesium		Sulphur <i>Soufre</i>	
<i>Variétés de mûrier</i>	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
Indigenous / Indigènes												
C ₆	2.32	2.20** <	0.17	0.18* >	1.18	1.24* >	2.00	2.40** >	0.21	0.18 =	0.19	0.18 =
C ₁₀	2.46	2.32** <	0.38	0.35* <	1.42	1.30** <	0.37	2.12** >	0.18	0.25** >	0.17	0.17 =
C ₁₄	2.20	2.15** <	0.23	0.20** <	0.89	1.05** >	1.64	2.08** >	0.21	0.16** <	0.18	0.17 =
DD	1.75	1.72 =	0.18	0.11** <	0.16	1.05** >	1.22	1.48** >	0.18	0.21* >	0.21	0.18* <
Hakkikalu	2.14	2.11 =	0.19	0.31** >	1.17	1.15 =	1.87	2.87** >	0.13	0.14 =	0.18	0.17 =
M ₅	2.48	2.27** <	0.28	0.23* <	1.24	1.20 =	2.15	1.87** <	0.23	0.21 =	0.24	0.25* >
Mysore local	2.68	2.48** <	0.18	0.42** >	1.82	1.12** <	2.18	3.24** >	0.13	0.14 =	0.18	0.17 =
S ₁	2.12	2.02** <	0.21	0.12** <	1.12	0.89** <	1.82	2.35** >	0.22	0.21 =	0.16	0.16 =
S ₁₃	2.18	2.03** <	0.19	0.18 =	1.38	1.25** <	1.86	2.35** >	0.26	0.24 =	0.21	0.18 =
S ₃₀	2.18	2.14** <	0.24	0.23 =	1.54	2.03** >	2.24	2.16** <	0.12	0.08* <	0.18	0.18 =
S ₃₆	2.37	2.18** <	0.19	0.21** >	1.35	1.28** <	1.57	2.62** >	0.19	0.23* >	0.19	0.16** <
Exotic / Exotiques												
EB	2.14	2.01** <	0.21	0.19** <	1.98	1.28** <	0.95	0.81** <	0.12	0.02** <	0.17	0.18 =
KNG	2.20	2.14 =	0.41	0.28** <	2.80	1.85** <	2.40	2.20** >	0.23	0.18** <	0.23	0.19*
Kosen	2.10	1.89* <	0.20	0.19 =	1.46	1.28** <	2.24	2.15** <	0.21	0.12** <	0.18	0.18 =

H = Healthy (Control) / *Sain (Témoin)*; D = Diseased / *Malade*, ** Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %*, * Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %*, ≥ more than H / *plus que H*, < less than H / *moins que H*, = did not change / *ne change pas*, DD = Dehra Dun, EB = English Black, KNG = Kairiyonezumigaeshi.

Table II. Changes in the mineral (micro elements) contents (ppm) of diseased (rust) mulberry leaves.

Tableau II. Changements de la teneur minérale (micro éléments) (ppm) des feuilles de mûrier malades (rouille).

Mulberry Varieties <i>Variétés de mûrier</i>	Zinc		Copper <i>Cuivre</i>		Iron <i>Fer</i>		Manganese	
	H	D	H	D	H	D	H	D
Indigenous / Indigènes								
C ₆	25.80	24.30** <	6.84	5.68** <	90	125** >	40.80	38.60* <
C ₁₀	30.50	32.40** >	6.22	5.90 =	123	113** <	38.50	34.00** <
C ₁₄	54.30	24.20** <	6.20	6.00 =	128	91** <	41.20	38.60** <
DD	34.80	23.20** <	4.28	4.65* >	121	162 ** >	50.84	52.40 =
Hakkikalu	33.70	33.20** <	4.78	4.54* <	136	135 =	34.56	32.80 =
M ₅	27.20	69.00** >	7.10	6.70* <	272	690** >	76.00	72.00 =
Mysore local	32.00	36.00* >	5.46	5.32 =	139	234** >	41.80	42.60 =
S ₁	42.70	34.10** <	4.28	3.84** <	182	112* <	38.60	41.50 =
S ₁₃	44.50	40.80** <	5.46	5.10 =	95	155** >	42.50	36.20**
S ₃₀	42.80	40.80** <	7.10	6.84 =	140	149* <	47.80	40.50** <
S ₃₆	28.40	51.50** >	6.38	5.87* <	130	142* >	32.70	28.80* <
Exotic / Exotiques								
EB	35.80	30.90* <	6.78	5.45* <	174	260** >	69.00	41.20** <
KNG	48.00	42.50** <	7.95	6.54** <	390	132** <	59.80	38.40** <
Kosen	50.80	45.20** <	7.85	7.45 =	390	132** <	42.00	38.50 =

H = Healthy (Control) / Sain (Témoin) ; D = Diseased / Malade ** = Significant at 1 % level / Significatif au seuil de 1 %, * = Significant at 5 % level / Significatif au seuil de 5 %

> more than H / plus que H, < less than H, moins que H, = did not change / ne change pas.

DD = Dehra Dun, EB = English Black, KNG = Kairyonezymigaeshi.

Calcium (Ca), Magnesium (Mg) and Sulphur (S) are secondary macronutrients essential for the growth of mulberry plants. Ca content was increased in all the indigenous varieties studied except M₅ and S₃₀; while it was more in C₁₀ variety compared to others varieties. The increase is due to resistance of pectic substances in the cell wall against enzymatic degradation as reported by Kiraly and Gilly (1976). The Ca content was significantly reduced in all the three exotic varieties studied. Many workers have reported both an increase (Nagaraja and Umesh Kumar 1988; Shree and Umesh Kumar 1990) as well as a decrease in the Ca content (Kulkarni and Kulkarni 1978; Mogle and Mayee, 1981) of diseased plants. A significant decrease in the Mg content was noticed in case of C₁₄ and S₃₀ varieties. On the contrary, in C₁₀, DD and S₃₆ varieties, it was increased. The other varieties (C₆, Hakkikalu, M₅, Mysore local, S₁, S₁₃) did not show any significant alteration. A highly significant reduction in Mg content was observed in all the three exotic varieties. Many reports are available which indicate that the disease enhances Mg content in host plants (Padmanabhan *et al.*, 1974; Nagaraja, 1987; Shree and Umesh Kumar, 1990). Nagaraja (1989) stated that the reduction in Mg content might be due to rapid utilisation by the pathogen or its translocation. As Mg is a highly mobile element, Karande (1984) reported that increase in its concentration in the infected leaves to be a response to pathogen-induced flux into the organ. As such, under pathogenic conditions, respiration increases. S plays a vital role in chlorophyll formation, nitrogen metabolism, synthesis of proteins,

vitamins, carbohydrates and proper development of mulberry plant tissues (Munirathnam Reddy *et al.*, 1990). S content was significantly reduced in DD, S₃₆ and KNG varieties, but it significantly increased only in M₅ variety. The other varieties (C₆, C₁₀, C₁₄, Hakkikalu, Mysore local, S₁, S₁₃, S₃₀, Kosen and EB) did not show any significant change. Anuradha and Shree (2001) observed an increase as well as a decrease in the S content of spot and powdery mildew affected mulberry varieties. Trace amounts of Ca, Mg and S when added to mulberry leaves stimulated metabolic activity in silkworms leading to increased rearing rate, silk content in the cocoon and higher fecundity rate (Ito and Niminura, 1966). Ca and Mg also accelerated the growth of silkworm and reduced the larval duration; decrease in the intake of these elements reduced the body weight of silkworm (Chakrabartha *et al.*, 1997).

Mulberry needs micronutrients like **Zinc (Zn)**, **Copper (Cu)**, **Iron (Fe)** and **Manganese (Mn)** in very small quantities for its nutrition in order to meet its optimum growth and development. They play an important role in enzymatic reactions. They also affect the activities of several groups of micro-organisms, thereby modifying the microbial processes influencing the supply of micronutrients in "available" form in one way or the other (Chakrabartha *et al.*, 1997). Zn is required for photosynthesis, protein synthesis, nucleic acid and carbohydrate metabolism in mulberry plants (Subbaswamy *et al.*, 1995). The assimilation of Zn in V instar silkworm is about 50 % of total nutrients among the several elements and is the only micronutrient element which is passed on to the silkworm seed. In addition, Zn is known to increase the pupal weight and filament length (Chakrabartha *et al.*, 1997). Lokanath *et al.*, (1986) have reported that excess of Zn content in mulberry leaf leads to reduction in cocoon yield.

Changes in the micro-element contents of rust affected mulberry leaves are given in Table II. There was a drastic and significant reduction in the Zn content of C₆, C₁₄, DD, Hakkikalu, S₁, S₁₃, S₃₀ varieties; But it increased in C₁₀, M₅, Mysore local and S₃₆ varieties. This increase was highly significant in M₅ variety compared to others. All the three exotic varieties recorded a highly significant reduction in the Zn content due to pathogenesis (rust). The results of the present work are in conformity with those of Jaglan and Sindhan (1988) and Umesh Kumar (1991). A significant increase in the Cu content was noticed only in DD variety, whereas the other indigenous (C₆, Hakkikalu, M₅, S₁, S₃₀ and S₃₆) as well as the exotic varieties (EB and KNG) showed a significant reduction. However, there was no significant change in the remaining varieties (C₁₀, C₁₄, Mysore local, S₁ and Kosen). There are many reports on the changes in Cu contents of diseased plants (Graham, 1983; Jaglan and Sindhan, 1988; Umesh Kumar and Shree, 1990). The Fe content was increased (C₆, DD, M₅, Mysore local, S₁₃, S₃₀, S₃₆) as well as decreased (C₁₀, C₁₄ and S₁) except in Hakkikalu variety where there was no change. It was found to be a very highly significant increase in M₅ when compared to others. Iron content was significantly low in KNG and Kosen, but high in EB among exotic varieties affected by rust disease. Similarly, Patil and Kulkarni (1977); Nagaraja and Umesh Kumar (1988); Shree and Umesh Kumar (1991) noticed an increase while Mogle and Mayee (1981); Karande (1984) observed a decrease in the Fe content of disease host tissues. The increase may be due to failure in translocation to the physiologically active site (Nagaraja, 1987). The decrease may be due to its competition with other iron-binding compounds (Karande, 1984). There was a significant reduction in the Mn content of both indigenous (C₆, C₁₀, C₁₄, S₁₃, S₃₀, S₃₆) and exotic varieties (EB and KNG) due to rust disease. In the other varieties (DD, Hakkikalu, M₅, Mysore local, S₁; Kosen) the change (increase and decrease) was not significant. The information available on the effect of pathogen on Mn content of diseased leaves is very scanty. Anuradha (2001); Anuradha and Shree (2001) have reported a reduction in the Mn content of diseased tissues; whereas Shree and Umesh Kumar (1991); Manjunath *et al.*, (2000) have reported its increase when infected by foliar fungal pathogens. Fe, and Mn have potentiality to enhance the larval development, filament length of single cocoon, cocoon weight and yield (Lokanath *et al.*, 1986).

CONCLUSION

The results of the mineral analysis in rust affected leaves of different mulberry varieties revealed that their content was either increased, decreased or unaltered due to *Peridiopsisora mori* infection (rust disease). The elements (macro and micro) comprise major part of plant nutrition. They are required in adequate quantities. Slight variation in this requirement causes an imbalance, which is very harmful and crucial for plants. Mulberry foliage forms the sole food for silkworms. Growth and development of silkworms depend on nutritive status of leaves. If, once there is such an imbalance in elemental contents (mineral nutrition), the leaf quality is severely deteriorated. This could be detrimental to silkworms. If the mineral content is increased due to infection, it induces toxicity symptoms not only in mulberry plants, but also in silkworms when they are fed on such leaves. Similarly, if an element is decreased due to infection, it causes deficiency / physiological disorders in leaves and they become malformed, deformed and nutritionally inferior. Obviously, the increase or decrease in the mineral content(s), affects the growth and development of silkworms, which consequently alters the silk quality (Ito and Niminura, 1966; Lokanath *et al.*, 1986; Shankar, 1990; Chakhabarthi *et al.*, 1997). Thus, the quantity of mineral elements present in the mulberry leaves has a decisive role in getting a successful cocoon crop.

REFERENCES

- ANURADHA R. (2001) Elemental analysis in the diseased leaves of different mulberry varieties. M. Sc., Dissertation, Bangalore University, Bangalore.
- ANURADHA R., SHREE M. P. (2001) Effect of fungal diseases on the nutritive composition of mulberry foliage. Natl. Sem. Mulb. Seri. Res. India. Nov. 26-28, KSSRDI, Bangalore. Abst. No.117, PP, 119.
- BHARGAVA B. S., RAGUPATHI (1993) Methods of analysis of soils, plants, water and fertilizers. Tandon, H. L. S. (eds). Fertilizers development and consultation organization, New Delhi. PP, 26-48.
- CHANDRAMMA M., SHREE, M. P. (1998) Influence of foliar diseases on the elemental contents of eri-silkworm food plants (Tapioca and Gulancha Pool / Champa). Sericologia, 38(3), 493-503.
- CHAKRABARTHI S., SUBRAMANYAM M. R., SINGHAL B. K., DATTA R. K. (1997) Nutrient deficiency management in mulberry. Central Research and Training Institute Publication, Mysore, PP, 5-15.
- GRAHAM R. D. (1983) Effect of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. Adv. Bot. Res., 10, 222-276.
- JAGLAN B. S., SINDHAN G. S. (1988) Changes in certain element in "Tikka" resistant and susceptible cultivars of ground nut. Indian J. Mycol. Pl. Pathol. 18(1), 55-56.
- ITO T., NIMINURA M. (1966) Nutrition of the silkworm *Bombyx mori* L. - Its specific nutrient requirements and its nutrition in relation to the mineral nutrition of its host plant mulberry, *Morus indica* L. Indian J. Exptl. Biol., 4, 31-36.
- KARANDE S. M. (1984) Physiological studies in crop plants. Ph. D. Thesis, Shivaji University, Kolhapur, Maharashtra State.
- KIRLAY Z., GILLY A. (1976) Effect of fertilizer on plant disease resistance. Report on the International Symposium Plant Immunity. Nov. 29 Dec. 2 (Ministry of food and Agric. USA).
- KULKARNI D. K., KULKARNI U. K. (1978) Physiology of mango leaves infected by *Capnodium ramosum* Cooke. Mineral contents, Biovigyanam, 4, 173-174.
- LOKANATH R., SHIVASHANKAR K., KASIVISWANATHAN K. (1986) Effect of foliar application of magnesium and micro-nutrients to mulberry on the quality and production of cocoons. Indian J. Seric., XXV(1), 40-41.
- MANJUNATH M. S., BONGALE U. D., DANDIN S. B. (2000) Critical limits of potassium and manganese in soil and leaf for mulberry. National Conference on Strategies for Sericulture Research and Development. Nov. 16-18, CSR&TI, Mysore. Abst No. MPP/P-9PP, 44.

- MATHUR A., VIDHYASEKARAN P., (1978) Physiology of resistance of rust in sunflower. Indian Phyto. Pathol., 31, 289-293.
- MOGLE T. R., MAYEE C. D. (1981) Alterations in the nutrient level in susceptible, moderately resistant pearl millet line following downy mildew (*Sclerospora graminicola*) infection. Indian J. of Mycol. Plant Pathol., 11, 189-194.
- MUNIRATHNAM REDDY M., SUBBASWAMY M. R., SINHA A. K. (1990) Sulphur nutrition in mulberry plants. Indian Silk, 29(7): 45-46.
- NAGARAJA T. G. (1987) Cytological, developmental and pathophysiological studies of some Indian fungi. Ph. D., Thesis, Shivaji University, Kolhapur.
- NAGARAJA T. G. (1989) Physiological changes in *Phyllanthus emblica* due to infection by *Ravenelia emblica* Syd: Mineral contents. Indian Bot. Repr., 8(1), 83-84.
- NAGARAJA T. G., UMESH KUMAR N. N. (1988) Physiology of *Mallotus philippinensis* Muck. leaves infected by *Phyllostica mararata* II. Mineral contents. Geobios, 15, 286-288.
- PADMANABHAN D. P., VIDHYASEKARAN P., RAJAGOPALAN L. K.S. (1974) Mineral composition of canker, halo and green regions of citrus leaves infected by *Xanthomonas citri*. Indian Phytopathol., 27, 640-641.
- PATIL B. D., KULKARNI V. K. (1977) Physiological changes in sunflower leaves due to infection of *Puccinia helianthis*. Biovigyanum, PP, 11-15.
- RANGASWAMY G., NARASIMHANNA M. N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C. R., JOLLY M. S. (1976) Sericulture Manual-I, Mulberry Cultivation, FAO, Rome. pp 1-5.
- SHANKAR M. A. (1990) Nutritional Management of mulberry and its effect on silkworm growth, development and silk quality. Ph. D. Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore.
- SHANKAR M. A. (1997) Handbook of mulberry nutrition. Published by Shetty, G. P., Chairman and Managing Director, Multiplex, Karnataka Agro Chemicals. pp, 1-87.
- SHANKAR M. A., PUTTASWAMY B., PUTTARAJU T. B., RAVI K. N., DEVAIAH M. C. (1995) Role of potassium in mulberry. Indian Silk, 29(2), 27-30.
- SHREE M. P., UMESH KUMAR N. N. (1990) Elemental composition of *Ricinus communis* leaves infected by *Alternaria ricini*, Geobios New Reports, 9, 80-81.
- SHREE M. P., UMESH KUMAR N. N. (1991) Changes in the elemental composition of mulberry leaves (*Morus alba* variety – S54) infected by foliar pathogens. Sericologia, 31(3), 441-444.
- SUBBARAYAPPA C. T., BONGALE U. D. (1997) Nitrogen nutrition of mulberry – A review. Indian J. Seric., 36(2), 92-98.
- SUBBASWAMY M. R., MUNIRATHNAM REDDY M., HIMANTHARAJ M. T., SINHA A. K. (1995) Importance of zinc nutrition in mulberry gardens. Indian Silk, 34(2), 23.
- UMESH KUMAR N. N. (1991) Physiological studies of the mulberry varieties infected by foliar pathogens. Ph. D., Thesis, Bangalore University, Bangalore.
- UMESH KUMAR N. N., SHREE M. P. (1990) Some physiological changes in leaves of *Morus alba* L. under pathogenesis. Geobios, 17: 140-141.

IMPACT DE LA MALADIE DE LA ROUILLE SUR LA NUTRITION MINERALE DES PLANTS DE MURIER

M. P. SHREE, R. ANURADHA & V. NAGAVENI

Department of Studies in Sericulture, Bangalore University, Jnana Bharathi Campus,
Bangalore – 560 056, Inde.

On a essayé d'évaluer l'impact de la maladie de la rouille (provoquée par *Peridiopsisora mori*) sur la nutrition minérale de onze variétés de mûrier indigènes (C6, C10, C14, DD, Hakkikalu, M5, Mysore local, S1, S13, S30, S36) et de trois exotiques (Kosen, KNG, English black). On analyse dix éléments (macro-azote, phosphore, potassium, calcium, magnésium, soufre, micro-zinc, fer, cuivre et manganèse). Chez les variétés indigènes, tous les éléments présentent soit une augmentation ou une baisse de leur teneur. Mais chez C10, S1 et S30, il n'y a pas de changement de la teneur en soufre provoquée par l'infestation par la rouille. Chez les variétés exotiques, il y a une diminution de toutes les teneurs élémentaires, sauf chez English black dont les teneurs en fer et en soufre augmentent tandis que chez Kosen la teneur en soufre est inaltérée. En général, il existe une variation variétale de la composition des feuilles de mûrier affectées par la rouille.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.) est le seul aliment de base satisfaisant pour les vers à soie (*Bombyx mori* L.) puisque leur croissance et leur développement sont très influencés par la qualité nutritionnelle de la feuille. L'un des obstacles principaux au succès de la récolte de mûriers est l'éruption des maladies. Chez les autres cultures on sait que tous les éléments nutritionnels varient avec la pathogénicité, tandis que chez le mûrier on ne sait pas grand chose sur eux. Bien qu'il y ait eu de nombreux travaux réalisés sur les différents aspects des maladies du mûrier, l'information disponible sur l'altération des teneurs en nutriments à cause des maladies est très mince. La maladie de la rouille du mûrier est provoquée par un champignon biotrophe *Peridiopsisora mori* (Barclay) [= *Cerotelium fici* (Cast.) = *Aecidium mori* (Sydow et Butler) Barclay]. Comme le pathogène est un parasite obligé (c'est à dire qu'il ne peut survivre et vivre que sur les tissus vivants de l'hôte), il envahit les tissus de l'hôte d'une manière très " subtile " et douce, de sorte que l'hôte n'est pas tué rapidement. Habituellement, on observe la maladie de la rouille sur les feuilles les plus épaisses. L'altération de leur qualité nutritionnelle aura donc un effet sur la croissance et le développement des vers à soie du dernier âge. Compte tenu de cela, nous avons entrepris cette étude pour évaluer l'impact de la rouille sur la nutrition minérale des plants de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

On recueille les feuilles affectées par la rouille et les feuilles saines de onze variétés de mûrier indigènes (C6, C10, C14, Dehradun (DD), Hakkikalu, M5, Mysore local, S1, S13, S30, S36) et de trois exotiques [Kosen, Kairyonezymigaeshi (KNG) et English black (EB)] dans les banques génétiques du Campus de Jnanabharathi, du *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute* (KSSR&DI), à Thalaghattapura, à Bangalore, de la Magnanerie de Tippu, et de l'Ecole de Formation en Sériciculture, de Channapatna. On lave, on sèche, et on réduit en poudre les échantillons de feuilles

et on les utilise plus tard pour analyser l'azote total et les teneurs en minéraux. On détermine l'azote total par la méthode de Kjeldahl (Bhargava et Ragupathi, 1993). Pour l'analyse minérale, 1 gramme d'échantillons de feuilles séchées en poudre est digéré en utilisant un mélange d'acide nitrique et d'acide perchlorique 9 : 4. Après refroidissement on filtre ce qui a été digéré. On prend les aliquots de cette solution et on estime les nutriments minéraux, le phosphore et le soufre (Spectrophotomètre Chemito UV 2000), le potassium (photomètre Flame Elico CL-360), le calcium, le magnésium, le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer (spectrophotomètre à absorption atomique). Les résultats sont analysés statistiquement en appliquant le test t de Student.

RESULTATS ET DISCUSSION

D'après le Tableau I, il est clair que la teneur en **azote** (N) (%) diminue dans les feuilles des quatorze variétés de mûrier étudiées (indigènes ainsi qu'exotiques). Parmi les variétés indigènes (série C), la baisse de la teneur en azote est la plus importante chez C₁₀ par comparaison aux autres. Il y a une baisse radicale chez S₃₆ par comparaison à S₁, S₁₃ et S₃₀, on remarque une légère baisse chez la variété M₅ par comparaison à Mysore local. La baisse de la teneur en azote chez les variétés DD et Hakkikalu n'est pas significative. Chez les variétés exotiques, on remarque une baisse très significative chez EB par comparaison à Kosen et KNG. La baisse de la teneur en azote de la variété KNG n'est pas significative. La qualité de la feuille de mûrier dépend de la teneur en azote (Shankar, 1997). Les protéines sont les constituants les plus importants des tissus vivants et représentent une part importante de la teneur totale en azote. Les protéines de la feuille de mûrier sont la source à partir de laquelle les vers à soie biosynthétisent la soie qui comprend deux protéines, la fibroïne et la sérécine (Rangaswamy et coll., 1976). La cible principale du pathogène envahissant est N, puisqu'il est nécessaire à sa différenciation structurale (Mathur et Vidhyasekaran, 1978). On trouve une corrélation très importante entre la teneur en azote de la feuille et le poids du corps, du cocon et de la coque du ver à soie (Subbarayappa et Bongale, 1997). Il existe un grand nombre de rapports montrant à la fois l'augmentation et la baisse du niveau d'azote suite à l'infestation chez des cultures variées (Karande, 1984 ; Umesh Kumar et Shree, 1990 ; Chandramma et Shree, 1998 ; Anuradha, 2001).

Le **phosphore** (P) est un nutriment principal majeur du plant de mûrier. Il a une relation étroite avec la synthèse des protéines, le métabolisme des graisses et des hydrates de carbone, la respiration, la photosynthèse et avec d'autres activités métaboliques. On observe une baisse, une augmentation ou aucun changement de la teneur en P des feuilles de mûrier atteintes par la rouille. Chez les variétés indigènes, elle diminue chez C₁₀, C₁₄, DD, M₅ et S₁, elle augmente chez les variétés C₆, Hakkikalu, Mysore local et S₃₆. Il y a seulement une différence négligeable et non significative de la teneur en P chez les variétés S₁₃ et S₃₀. Chez les variétés exotiques, KNG présente une diminution très significative par comparaison à EB, chez Kosen, il n'y a pas de changement. La carence en P affecte l'absorption des autres éléments dans les feuilles de mûrier, ce qui à son tour gêne la croissance et les caractères économiques du ver à soie (Ito et Niminura, 1966 ; Chakrabarthy et coll., 1997).

Chez le mûrier, le **potassium** (K) a un rôle dans l'assimilation du carbone, le métabolisme de l'azote, il active plusieurs types d'enzymes et contrôle la respiration. Il joue aussi un rôle important chez la feuille de qualité à haut rendement (productivité). La qualité de la feuille a un effet direct sur l'élevage du ver à soie. La forte alcalinité du jus gastrique dans le corps du ver à soie vient du K et des composés de sodium présents dans le sang. La condition très alcaline du liquide digestif a un pouvoir germicide puissant contre les pathogènes. Le potassium est un élément unique qui contribue de manière importante à la croissance du ver à soie. De plus, le potassium a un effet stimulant sur la synthèse des protéines y compris les protéines de la soie dans les glandes sérécigènes et sur la fonction de l'ovaire (Shankar et coll., 1995). Les variétés de mûrier indigènes attaquées par la maladie de la rouille présentent une augmentation (variétés C₆, C₁₄, DD et S₃₀) et une baisse significatives (C₁₀, Mysore local, S₁, S₁₃ et S₃₆) tandis que les variétés Hakkikalu et M₅ ne présentent pas de changement

significatif. Cependant, les variétés exotiques enregistrent une diminution très significative. De nombreux chercheurs ont rapporté une baisse de la teneur en K à cause de l'infestation (Jaglan et Sindhan, 1988 ; Nagaraja et Umesh Kumar, 1988). Tandis que certains chercheurs (Mogle et Mayee, 1981) ont rapporté une augmentation.

Le **calcium** (Ca), le **magnésium** (Mg) et le **soufre** (S) sont des macronutriments secondaires essentiels pour la croissance des plants de mûrier. La teneur en Ca augmente chez toutes les variétés indigènes étudiées sauf chez M₅ et S₃₀ tandis qu'elle est plus élevée chez la variété C₁₀ par comparaison aux autres variétés. Comme l'ont reporté Kiraly et Gilly (1976) l'augmentation est due à la résistance des substances pectiques dans la paroi cellulaire contre la dégradation enzymatique. La teneur en Ca diminue considérablement chez les trois variétés exotiques étudiées. De nombreux chercheurs ont rapporté à la fois une augmentation (Nagaraja et Umesh Kumar 1988 ; Shree et Umesh Kumar 1990) ainsi qu'une baisse de la teneur en Ca (Kulkarni et Kulkarni 1978 ; Mogle et Mayee, 1988) des plants malades. On remarque une diminution significative de la teneur en Mg chez les variétés C₁₄ et S₃₀. Au contraire, chez les variétés C₁₀, DD et S₃₆, elle augmente. Les autres variétés (C₆, Hakkikal, M₅, Mysore local, S₁, S₁₃) ne présentent pas d'altération significative. On observe une diminution très significative de la teneur en Mg chez les trois variétés exotiques. De nombreux rapports indiquent que la maladie augmente la teneur en Mg chez les plantes hôtes (Padmanabhan et coll., 1974 ; Nagaraja, 1987 ; Shree et Umesh Kumar, 1990). Nagaraja (1989) a montré que la diminution de la teneur en Mg pourrait être due à une utilisation rapide par le pathogène ou à sa translocation. Comme le Mg est un élément très mobile, Karande (1984) a rapporté que l'augmentation de sa concentration dans les feuilles infestées constitue une réponse au flux induit par le pathogène dans l'organe. Compte tenu de cela, dans des conditions pathogènes, la respiration augmente. Le soufre joue un rôle vital dans la formation de la chlorophylle, le métabolisme de l'azote, la synthèse des protéines, des vitamines, des hydrates de carbone et le développement correct des tissus du plant de mûrier (Munirathnam Reddy et coll., 1990). La teneur en S diminue significativement chez les variétés DD, S₃₆ et KNG et elle augmente seulement chez la variété M₅. Les autres variétés (C₆, C₁₀, C₁₄, Hakkikal, Mysore local, S₁, S₁₃, S₃₀, Kosen et EB) ne présentent pas de changement significatif. Anuradha et Shree (2001) ont observé une augmentation et une diminution de la teneur en S chez les variétés de mûrier affectées par le mildiou de la tâche et le mildiou poudreux. Quand on ajoute des quantités traces de Ca, Mg et de S aux feuilles de mûrier, cela stimule l'activité métabolique des vers à soie, ce qui entraîne une augmentation du taux d'élevage, de la teneur en soie dans le cocon et un taux de fécondité plus élevé (Ito et Niminura, 1966). Le Ca et le Mg accélèrent aussi la croissance du ver à soie et diminuent la durée larvaire, la baisse de l'absorption de ces éléments diminue le poids du corps du ver à soie (Chakrabarthy et coll., 1997).

Le mûrier a besoin de micronutriments comme le **zinc** (Zn), le **cuivre** (Cu), le **fer** (Fe) et le **manganèse** (Mn) en très petites quantités pour sa nutrition de manière à optimiser sa croissance et son développement. Ils jouent un rôle important dans les réactions enzymatiques. Ils ont aussi un effet sur les activités de plusieurs groupes de micro-organismes, ce qui modifie par là-même les processus microbiens influençant l'apport en micro-nutriments sous forme " disponible " d'une manière ou d'une autre (Chakrabarthy et coll., 1997). Le Zn est nécessaire pour la photosynthèse, la synthèse des protéines, pour les acides nucléiques et le métabolisme des hydrates de carbone chez les plants de mûrier (Subbaswamay et coll., 1995). L'assimilation du Zn chez le ver à soie du 5^{ème} âge représente environ 50 % de l'ensemble des nutriments et il est le seul micronutriment qui est transmis à la graine de ver à soie. De plus, on sait que le Zn augmente le poids nymphal et la longueur du filament (Chakrabarthy et coll., 1997). Lokanath et coll., (1986) ont rapporté que l'excès de Zn dans la feuille de mûrier entraîne la diminution du rendement en cocons.

Les changements des teneurs en micro-éléments des feuilles de mûrier affectées par la rouille sont présentés dans le Tableau II. Il y a une diminution radicale et significative de la teneur en Zn chez les variétés C₆, C₁₄, DD, Hakkikal, S₁, S₁₃, S₃₀. Mais, elle augmente chez les variétés C₁₀, M₅, Mysore local et S₃₆. Cette augmentation est très significative chez la variété M₅ par comparaison aux

autres. Les trois variétés exotiques enregistrent une diminution très significative de la teneur en Zn à cause de la pathogénèse (rouille). Les résultats de ce travail sont en conformité avec ceux de Jaglan et Sindhan (1988) et d'Umesh Kumar (1991). On ne remarque une augmentation significative de la teneur en Cu que chez la variété DD, tandis que les autres variétés indigènes (C6, Hakkikalu, M5, S1, S30 et S36) ainsi que les variétés exotiques (EB et KNG) présentent une diminution significative. Cependant, il n'y a pas de changement significatif chez les autres variétés (C10, C14, Mysore local, S1 et Kosen). Il existe de nombreux rapports sur les changements des teneurs en Cu chez les plants malades (Graham, 1983 ; Jaglan et Sindhan, 1988 ; Umesh Kumar et Shree, 1990). La teneur en Fe augmente (C6, DD, M5, Mysore local, S13, S30, S36) et diminue (C10, C14 et S1) sauf chez la variété Hakkikalu où il n'y a pas de changement. On constate une augmentation très significative chez M5 par comparaison aux autres. La teneur en fer est significativement basse chez KNG et Kosen mais elle est élevée chez les variétés exotiques affectées par la maladie de la rouille. De même, Patil et Kulkarni (1977) ; Nagaraja et Umesh Kumar (1988) ; Shree et Umesh Kumar (1991) ont remarqué une augmentation tandis que Mogle et Mayee (1981) ; Karande (1984) ont observé une baisse de la teneur en Fe dans les tissus hôtes malades. L'augmentation pourrait être due à l'échec de la translocation vers le site physiologiquement actif (Nagaraja, 1987). La baisse pourrait être due à sa compétition avec d'autres composés liant le fer (Karande, 1984). Il y a une diminution significative de la teneur en Mn chez les variétés à la fois indigènes (C6, C10, C14, S13, S30, S36) et exotiques (EB et KNG) à cause de la maladie de la rouille. Chez les autres variétés (DD, Hakkikalu, M5, Mysore local, S1 ; Kosen) le changement (augmentation et baisse) n'est pas significatif. L'information disponible sur l'effet du pathogène par rapport à la teneur en Mn des feuilles malades est très rare. Anuradha (2001) ; Anuradha et Shree (2001) ont rapporté une diminution de la teneur en Mn dans les tissus malades ; tandis que Shree et Umesh Kumar (1991) ; Manjunath et coll., (2000) ont rapporté son augmentation quand les tissus sont infestés par des pathogènes fongiques foliaires. Le Fe et le Mn ont un potentiel pour améliorer le développement larvaire, la longueur du filament d'un cocon, le poids du cocon et le rendement en cocons (Lokanath et coll., 1986).

CONCLUSION

Les résultats de l'analyse minérale des feuilles affectées par la rouille de différentes variétés de mûrier révèlent que leur teneur augmente, baisse ou est inaltérée par l'infestation par *Peridiopsora mori* (maladie de la rouille). Les éléments (macro et micro) constituent la partie la plus importante de la nutrition des plantes. Ils sont nécessaires en quantités adéquates. Une variation légère de ce besoin entraîne un déséquilibre, qui est très nuisible et critique pour les plantes. Le feuillage du mûrier constitue la seule nourriture des vers à soie. La croissance et le développement des vers à soie dépendent du statut nutritif des feuilles. Si un tel déséquilibre de la teneur en éléments (nutrition minérale) se produit une fois, la qualité de la feuille se détériore sévèrement. Cela peut être nuisible pour les vers à soie. Si la teneur minérale augmente à cause de l'infestation, cela induit des symptômes de toxicité non seulement pour les plants de mûrier mais aussi chez les vers à soie quand on les nourrit avec ces feuilles. De même, si un élément diminue à cause de l'infestation, cela entraîne une carence/ des désordres physiologiques dans les feuilles et elles deviennent malformées, déformées et inférieures sur le plan nutritionnel. Evidemment, l'augmentation ou la diminution de la teneur en minéraux affectent la croissance et le développement des vers à soie, ce qui par conséquent altère la qualité de la soie (Ito et Niminura, 1966 ; Lokanath et coll., 1986 ; Shankar, 1990 ; Chakhabarthi et coll., 1997). Ainsi, la quantité en éléments minéraux présents dans les feuilles de mûrier joue un rôle décisif pour obtenir une récolte réussie de cocons.