

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*)

SOMMAIRE - CONTENTS

Revue / Review

- Development of cocoon cooking technology – a review** 351
 Revue sur la technologie de cuisson des cocons 367
 G. HARIRAJ, HARUO KINOSHITA & T. H. SOMASHEKAR

Articles scientifiques / Scientific paper

- Ultrastructure of ingress, infection and sporulation of various pathogens causing foliar diseases in mulberry – an appraisal** 377
 Evaluation ultrastructurale de l'entrée, de l'infestation, et de la sporulation de divers pathogènes provoquant des maladies foliaires chez le mûrier 393
 V. P. GUPTA, VINEET KUMAR, R. K. RAJAN & S. B. DANDIN

- Heat shock response and analysis of egg proteins in new bivoltine strains of *Bombyx mori*** 403
 Réponse au choc thermique et analyse des protéines de l'œuf chez les nouvelles souches bivoltines de *Bombyx mori* 409
 H. B. MANJUNATHA, A. ZAMOOD, B. C. VASUDHA & H. S. APARNA

- Effect of *Nosema bombycis* Naegeli (Nosematidae) infection on the silk glands of silkworm *Bombyx mori* L. (Bombycidae) – an ultrastructural study** 413
 L'effet de l'infestation par *Nosema bombycis* (Nosematidae) sur les glandes séricigènes du ver à soie *Bombyx mori* L. (Bombycidae) – étude ultrastructurale 423
 N. B. JYOTHI, C. S. PATIL & C. M. DASS

- A unique sheathed sensilla on the abdominal surface of the muga silkworm, *Antheraea assamensis* (Lepidoptera : Saturniidae)** 427
 Une sensille unique sur la surface abdominale du ver à soie muga, *Antheraea assamensis* (Lepidoptera : Saturniidae) 441
 SURENDRA SINGH¹, SUDIP DEY, D. K. SHARMA A. RAGHUVARMAN & R. CHAUDHURY

Rapports techniques / Technical reports

- Studies on reeling – Influence of cocoon cooking, condition and croissure length on quality characteristics of raw silk of Indian multibivoltine cocoons** 447
 Etudes sur le dévidage – Influence de la cuisson des cocons et de la longueur de croissure sur les caractéristiques de qualité de la soie grège sur les cocons polybivoltins indiens 455
 SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR

- Rapid clonal propagation of mulberry variety – S54 through *in vitro* culture of axillary bud** 461
 Multiplication clonale rapide de la variété de mûrier S54 par culture *in vitro* de bourgeons axillaires 471
 R. KAVYASHREE, M. C. GAYATRI & H. M. REVANASIDDAIAH

Brief note / Note brève

Screening of natural essential oils for uzifly management	475
Evaluation des huiles essentielles naturelles pour lutter contre la mouche uzi	481
H. P. PUTTARAJU, B. M. PRAKASH, SUMITHRA & N. M. GURUPRASAD	

DEVELOPMENT OF COCOON COOKING TECHNOLOGY - A REVIEW

G. HARIRAJ*, HARUO KINOSHITA & T. H. SOMASHEKAR

1. Central Silk Technological Research Institute, BTM Layout, Bangalore – 560 068, India.
2. National Institute of Sericultural and Entomological Science, Matsumoto, Japan 390-0812.

Cocoon cooking is the heart of the reeling process. Standardization of cooking process parameters for cocoons is a difficult task for the filature managers to achieve proper reeling performance and quality of raw silk. A review of work done so far in development of cooking technology has been described for better understanding of the technology as well as adoption of the same in the silk filatures.

Keywords : Cooking technology, retting, high permeation, low permeation, cooking, adjustment temperature, pan cooking, conveyor cooking.

INTRODUCTION

Cooking mechanism basically depends on various factors like cocoon characteristics, sericin characteristics, water characteristics, etc.. Based on silkworm race, rearing conditions, cocoon drying and storage conditions etc., the sericin quality and characteristics vary considerably [Hariraj (1994)]. In order to soften the sericin suitably, the cocoon cooking process is carried out. Cocoon cooking is a process in which water is made to penetrate from outside to the inside and inside to the outside of the cocoon shell, in order to soften the sericin uniformly throughout the cocoon shell, so that the cocoon filament unwinds smoothly up to the end without break. 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. The details of each treatment of the cooking mechanism are given in Table I [Kinoshita (1997)].

In reeling of silk, the productivity and raw silk recovery (quantity) are dependent mainly on the cooking technology [Shimazaki (1964)]. Cooking of cocoons leads to softening of the sericin layers and agglutination between the cocoon filaments cross over points (cocoon layer and sericin) to release the resistance in the cocoon layers, by using water and steam. Sericin is swollen and softened so that the agglutination of filaments is released during reeling, without breakage and damages. The technology used for cooking, is to process the cocoon layer and soften sericin so that agglutination points are released [Kinoshita *et al.*, (1982a)].

Cooking temperature of 80° - 90° suitably swells and softens the sericin at the cross over points in cocoon filaments in order to achieve better reeling. However, if the temperature is increased beyond 90° C then the sericin dissolution increases steeply as reported by Oku (1940b) and Shimazaki (1964). The effect of cooking water temperature on sericin solubility is given in the Figure 1.

Komatsu (1975) studied sericin solubility and its relation to structural properties using ultra violet rays and temperature of hot water, to the sericin solubility. Percentage of four types of sericin reported

* Author to whom correspondence may be addressed.

to be available in the raw silk is estimated. Further, the relation between cocoon shell sericin and sericin solubility of different types of sericin established. It was observed that, cocoon shell has easily soluble sericin in outer layer whereas inner layer sericin is difficult to solubilize. When the cocoons are cooked at 100° C without following a temperature profile, the outer layer cocoon shell sericin swells easily and softened leading to a lot of waste generation, thus reducing the raw silk percentage. However, if the cocoons are properly cooked following suitable temperature profiles, cooking variation in the cooking shell layers would be minimum leading to better raw silk percentage, lower cleanness defects, less dropped cocoons and uniform yarn agglutination. Thus the yarn is easily released from the cocoons [Shimazaki (1961a)].

Table I. Mechanism of cocoon cooking.

Tableau I. Mécanisme de cuisson des cocons.

Pre-treatment before cooking	Pre-treatment for cooking	Cooking treatment	Adjustment treatment
<i>Pre-traitement avant la cuisson</i>	<i>Pre-traitement pour la cuisson</i>	<i>Traitement de cuisson</i>	<i>Traitement d'ajustement</i>
Steaming <i>Cuisson à la vapeur</i>	Retting <i>Rouissage</i>	Cooking <i>Cuisson</i>	Adjustment <i>Ajustement</i>
Vacuum Permeation <i>Imprégnation à vide</i>	High temperature for permeation <i>Température élevée pour l'imprégnation</i>		Finishing <i>Apprêt</i>
Water spraying <i>Vaporisation d'eau</i>	Low temperature for permeation <i>Basse température pour l'imprégnation</i>		Adjustment entry temperature <i>Température d'ajustement à l'entrée</i>
	Volume of water <i>Volume d'eau</i>	Steam volume <i>Volume de vapeur</i>	Slope of temperature <i>Pente de la température</i>
	Water temperature and duration <i>Température de l'eau et durée</i>	Steam temperature and duration <i>Température à la vapeur et durée</i>	Finishing temperature <i>Température d'apprêt</i>
	Water quantity / kind <i>Quantité / type d'eau</i>	Water head pressure <i>Pression de (la colonne) d'eau</i>	Water availability <i>Disponibilité en eau</i>

[Kinoshita (1997)]

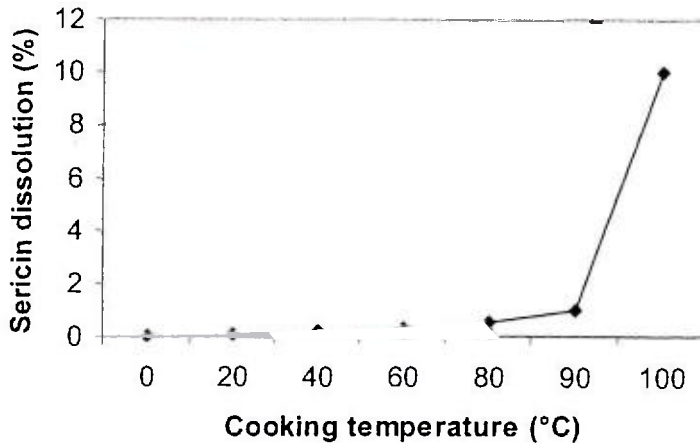


Figure 1. Effect of sericin dissolution on cooking temperature.

Figure 1. Effet de la dissolution de la sérécine sur la température de cuisson.

[Oku (1940b), Shimazaki (1964)]

The theory, involved in cocoon cooking process is defined as entry suction phenomenon by Kinoshita *et al.*, (1989). The details are shown in Table II.

Table II. Theory of cocoon cooking – Entry suction phenomenon.

Tableau II. Théorie sur la cuisson des cocons – Phénomène de succion à l'entrée.

Particulars	Entry suction in	
	Gaseous state (air)	Water medium
Détails	Succion à l'entrée	
	à l'état gazeux (air)	dans l'eau
In dry cocoon <i>Chez le cocon sec</i>	Air enters freely <i>L'air entre librement</i>	Water does not penetrate <i>L'eau ne pénètre pas</i>
In wet cocoon <i>Chez le cocon humide</i>	Air permeation difficult <i>Pénétration difficile de l'air</i>	Water enters freely <i>L'eau entre librement</i>

[Kinoshita *et al.*, (1989)]

Kinoshita and Tajima (1990) further elaborate that, when the cocoons are in dry condition, air passes through the cocoon shell but water does not penetrate easily through the cocoon shell. This is because the dried cocoon shell develops water-repelling character on the shell surface due to heat treatment received in drying process. When these cocoons are forcibly wetted in water, the water is absorbed in the cocoon shell. In the wetted cocoons, water passes through the cocoon shell easily but air does not permeate, as sericin in swelling during wet treatment blocks the pores of the shell. This theory is used at every stage of cocoon cooking to achieve suitable penetration of water into the cocoons.

Various types of cocoon cooking methods are open pan, two pan, three pan, stationary pressurised and conveyor pressurised cooking.

OPEN PAN COCOON COOKING PROCESS

Open pan cooking is the process of treating the cooking at a single temperature in a single pan for less duration, with the sole purpose of grouping the ends of the cocoons. Though this method is popular in Indian reeling industry, it only leads to poor productivity and quality. The mis-conception of the reelers is that, once the cocoons are put in hot water in the cooking pan, the cocoons are cooked and true ends of the cocoons are picked. They also assume that the cooking process is completed in single temperature treatment itself. Due to the inherent nature of Indian cocoons, the cocoons yield thread even at a single temperature treatment. However, the process of cooking has just begun and further treatment of cocoons is essential to cook layers of the cocoon shell effectively, is not understood by the reelers.

The method of pan cooking is carried out, at 80° to 90° C to swell the sericin. However, the cocoons will not be properly cooked, due to over cooking of outer layers and under cooking of inner layers, thereby the reelability is reduced and waste generation increased. Further, dropped cocoons remained floating on the surface of reeling water while reeling, as a result constant number of reeling running cocoons could not be properly maintained affecting the denier of raw silk produced. Hariraj *et al.*, (1997a) have reported the effect of open pan cooking temperature and duration on water absorption inside the cocoon and shell as well as reeling performance and quality of raw silk of Indian multi-bivoltine cocoons.

TWO / THREE PAN COCOON COOKING PROCESS

Two pan cooking method was adopted in Japan in early times. Two pan cooking permits achieving of different temperatures by manipulating the steam input to suit the different qualities of cocoons. Sonwalkar (1982) has conducted studies on three pan cooking methods by adopting temperature profiles of low-high low method and high-low-high method. He has inferred that low-high low temperature profile gave better results compared to high-low-high temperature profile while cooking Japanese bivoltine cocoons. Hariraj and Somashekar (2002 a, b, c, 2002 a, b, c, 2002, a, b, c, 2002, 2002, 2003, 2004) have standardised the retting temperature, permeation temperature, cooking temperature and adjustment temperature and durations to be adopted in two pan cooking for Indian multi-bivoltine cocoons using water absorption inside the cocoon and shell, colour diffusion in the cocoon shells as well as reeling performance and quality of raw silk. In Indian conditions, two/three pan cooking methodologies are being popularised presently, to improve the cooking performance compared to open pan cooking technology.

PRESSURISED COCOON COOKING PROCESS

The pressurised cooking technology consists of two contrivances i.e., stationary circular pressurised cooking machine and automatic conveyor cooking machine. The stationary circular

pressurised cooking machine is called as Oshita model in Japan and this model is now being popularized in the silk reeling industry in India [Shimizu (1997)]. Hariraj and Somashekar (2003) have standardised the pressurised cooking conditions for Indian multi-bivoltine cocoons. Subhas V. Naik and Somashekar (2003a, b, 2003a, b, c, 2004) have standardized the retting temperature, permeation temperature, cooking temperature and adjustment temperature and durations to be adopted in pressurised cooking for Indian bivoltine hybrid cocoons reared under different temperature and humidity conditions. The methodologies adopted in both types of pressurised cooking machines are almost the same, however, in stationary circular pressurised cooking machine there is limitation of using wide temperature variation profiles. The conveyor-cooking machine is most suitable for achieving better cooking results and reeling performance [Kinoshita et al., (1993a)]. In Indian conditions, irrespective of the reeling devices used the cooking technology adoption and selection of suitable cooking temperatures and duration depending on the cocoon quality should be further addressed.

HISTORICAL BACKGROUND

Basically, the cocoons can be cooked lightly (under) at high temperature to soften the sericin and to obtain the ends from the cocoons. This method of pan cooking is carried out at 80 to 90° C to swell the sericin so that raw silk percentage was increased. In 1886 these types of cooking was adopted to the extent of 80% of the filatures in Japan. Because of under cooking, the cocoons will not be properly cooked, so that waste production is increased and reelability is reduced. Also, this process helps in reeling poor cocoons since it will not penetrate water inside, so that productivity and raw silk percentage was increased. However, on the other hand, dropped cocoons in the reeling basin influence the maintenance of cocoons by the reeler and it affects the denier of raw silk produced. Based on the sericin swelling and variation in cooking, defects will be more and the quality is affected. However, management of the filature was good with better economics.

In 1901, the export requirement of New York could not be met by Europe. During the period, China and Japan silk was very much imported, which was suitable for warp purpose. The Japan silk was having very good size deviation and cohesion characteristics, which was liked by the Americans. During the same period in Japan, Sunken system of reeling was developed. This cooking system softens the shell uniformity and maximum amount of water will be made to penetrate inside the cocoon, which made the cocoon to sink inside the water. In order to separate the running cocoons and dropped cocoons the sunken system is very much suitable and the number of cocoons being reeled was clearly seen and the reeler was able to maintain the number of cocoons according to the denier of raw silk and produced raw silk with low size deviation. Further, cohesion was improved and silk reeling productivity was also improved. However, in order to achieve sunken system of reeling, the suitable cocoon-cooking machine was to be invented and it becomes necessary. Thus, during this period the cooking operation was separated from reeling operation. The quality of raw silk thus produced was highly better and suitable for warp quality.

During 1911, the quality of raw silk produced in Japan was well accepted by the market and fetched better price also. During the period National Institute of Sericultural and Entomological Science was established and research and training in reeling technology was started. The technology was introduced to the reelers in various part of Japan and training was given with better benefits. The objective of the training was to achieve production of warp quality of raw silk using the latest cooking and reeling technology. This technology was able to soften the shell sericin suitably and achieve full wetting of the cocoons. However, it reduces the raw silk percentage compared to pan type of cooking. Further, this technology also varied the colour of the silk during the production as the melted cocoons also reeled in the same basin, which spoils the water quality during reeling [Kinoshita (1997)].

Yamamoto (1917) further developed a process, which is called as semi-sunken system of reeling. This system of reeling was in between floating and sunken system of reeling and raw silk percentage

and productivity was improved, which was better than fully sunken system of reeling. Thus, using cooking technology – both qualities as well as productivity was improved and, hence many filatures started using this technology. In 1918, there were no filature using this technology, however, in 1924, 47% of filature adopted this technology and in 1927, 57% adopted the same. Though the quality and productivity were improved in the filature, from the management point of view, raw silk yield from cocoon was also made as an important objective and then in the filature all the three factors were made as objectives and the filatures started establishing the suitable technology to achieve the same.

Japanese raw silk technology was able to export warp raw silk for a very long period. However, America has slowly started using silk in socks and export increased many folds. This has led to problems in evenness of raw silk produced, as it reflected in socks. So, further improvement in quality was necessitated. Thus, the reeling speed was 200 mpm (meters per minute) were reduced to 40 mpm and mixed cocoon reeling was followed to achieve best quality raw silk. In 1927, reeling machine (4 ends with sitting) was converted to multiend reeling machine with standing posture was introduced. M/s Katakura Seishi was the first to convert its old reeling machine with multiend reeling machines and introduced new management techniques i.e. so far only productivity was made important which was converted into quality and this is called as Midorikawa raw silk and got 33% premium on price. However, the transformation of multiend reeling machines in the filature with quality as an objective was very slow. It was only 10% change in 1932 and in 1940 it was 36% converted and total change was achieved only in 1945 and afterwards [Kinoshita (1997)].

In 1950, mixed cocoon reeling suitable for multiend reeling machine in relation to the size curve of the cocoons was developed. This has relation with size deviation of raw silk and suitable technology was developed. Oki (1955) has developed the denier indicator, which will detect the size of raw silk during reeling. Further, in multiend reeling machine minimum denier indicating reeling technology was developed which was better than fixed and mixed cocoon reeling technology. During 1965, the multiend reeling machine was totally converted into automatic reeling machine with denier indicating device along with conveyor machines in Japan [Kinoshita (1997)].

IMPORTANCE OF COCOON COOKING PROCESS

Cocoon cooking is a process in which the hot water is made to permeate from outside the cocoon shell to inside the cocoon shell and vice-versa, so that the shell layers and sericin at the cross over points would be suitably softened. During the process of cocoon cooking, the air inside the cocoon shell is heated, expands and escapes through the cocoon shell. The expelling of air from inside the cocoon shell creates a pressure difference between the inside and outside the cocoon shell, permitting to permeate water into the cocoons. Efficient cocoon cooking therefore involves retting of cocoons, high temperature for permeation, low temperature for permeation, cooking, adjustment and finishing processes [Kinoshita *et al.* (1980)].

It is observed from the studies carried out so far that cocoon shell sericin swelling and softening degree has a highly significant relation with pre-treatment process in cocoon cooking. Particularly, water absorption and moisture content in shell and water content in cocoon and shell, heat transmission and heating media have a direct bearing on cocoon cooking process. In order to achieve swelling of the cocoon shell to the desired level, the following cocoon cooking parameters i.e., retting, permeation, cooking, adjustment and finishing temperatures and durations are to be controlled.

Even after 100 years of studies and experience it has not been possible to arrive at standardization of temperature profiles and durations for cocoon cooking. Japanese researchers opine that cooking temperatures and durations selection could be done on the day of reeling depending upon various parameters prevailing in the filatures [Kinoshita *et al.*, (1993a)]. Before starting of mass production, the practice in the Japanese filatures was to test a small batch of cocoons in a cooking machine with a set of temperature profiles and the cocoons assessed for its suitability for reeling by a group of personnel working in the filature. Then, the most appropriate cooking temperature profile was selected

and set and continuous production commenced. If this were the practical approach in the organised Japanese filatures while handling large quantities of high quality cocoons, it would appear that under Indian conditions such a practical approach is all the more justified. Hence there is a need for understanding the behaviour of Indian multi-bivoltine cocoons during the process of cooking particularly the hot air dried cocoons.

Cocoon cooking technology adopted in modern filatures involves retting, permeation, cooking, adjustment and finishing operations. These processes are to be carried out in the same sequence to achieve effective cooking of the cocoons. The temperature and duration vary depending upon the cocoon quality.

RETTING TREATMENT

Retting is the first process in cocoon cooking. The objective of retting of cocoons is to enable the dry cocoon shell to absorb water molecules, so that cooking is facilitated. When the cocoons are retted in hot water capillaries are developed depending on the shell structure and water penetrates inside the cocoon shell. Once the shell is moistened, more water can be absorbed subsequently. Shimazaki and Sekijima (1961b), Shimazaki and Yamamoto (1962a) and Shimazaki *et al.* (1966) studied the relation between retting process and water penetration into the cocoon. In order to avoid over cooking of the cocoon shell, moisture content in the cocoon shell, permeation of water into the cocoon shell and the cocoon cooking technology was studied and suggested to the filatures. Further 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. Pre-treatment of cocoon and its effect on moisture content in cocoon shell was also studied and its importance highlighted. Moriee (1942 and 1959) developed cooking technology using lower temperature treatment in the retting part, so that after wetting air is allowed to escape and will almost dry the cocoons after retting. Hariraj and Kinoshita (1994) reported the influence of retting temperature on water permeation into the cocoon and moisture content in the cocoon shell for both Indian and Japanese bivoltine hybrid cocoons and inferred that water absorption increased with the increase in retting temperature.

The hot air dried cocoons, which are dried to optimum level develop water repellent character and pose difficulties in cocoon cooking. Therefore, treating these cocoons using a single temperature as practised in the Indian silk reeling industry sector would reduce productivity and impair raw silk quality. Thus selection of suitable temperature for retting of Indian multi-bivoltine cocoons would facilitate cocoon cooking.

PERMEATION TREATMENT

In order to achieve water penetration into the inner layers of the cocoons, the cocoons are treated at high temperature when the air inside is heated and expands. Hot and expanded air is then expelled from inside the cocoon creating a pressure difference between the inside of the cocoon and outside. This pressure difference leads to penetration of some quantity of steam and hot water into the cocoon through the cocoon layers. High temperature of permeation treatment is immediately followed by low temperature treatment when the cocoons treated at high temperature are immersed in low temperature water bath. When this is done, firstly, the steam that has penetrated inside the cocoon during high temperature treatment is condensed into water and secondly higher pressure difference is created inside the cocoon, permitting more water to penetrate into the cocoons. During the permeation treatment inner layer cocoon shell sericin is swollen and softened uniformly, leading to better reeling efficiency and increased productivity. Yamamoto (1917) used 95° C for 25 seconds high temperature permeation, followed immediately by 65° C for 5 seconds low permeation in hot water, to understand cocoon pre-treatment. Yamamoto further developed a process in which pre-treated cocoons were treated in simmering water temperature to enable water penetration into the cocoons, so that the

cocoons that were in horizontal position will turn into vertical position with its head above the water level. In this condition, he reported that, the cooking was completed and appropriate / suitable for reeling.

Chiba (1927) developed a technology in which over cooking of cocoon shell is avoided and proper wetting of cocoon shell is achieved by steam permeation. Katsuno (1969, 1973, 1974) and Katsuno *et al.*, (1978) studied the effect of cocoon pre-treatment on water absorption, moisture content in the shell, pre-treatment of cocoons during cooking process and its effect on reeling performance and inferred that pre-treatment of cocoon cooking significantly altered reeling performance. Hiashi (1935) reported a method for proper cooking of the cocoon shell. Reeling temperature, reeling speed were fixed to achieve the reeling tension of 0.3 g/d using cooking of cocoons, so that raw silk percentage and quality of raw silk could be improved. This system is referred to as "reeling tension process theory" and associated with achieving uniform tension using the cooking technology.

Thus, permeation in cooking process facilitates suitable softening of sericin from outer to inner layer. In Indian reeling units permeation operation is achieved indirectly i.e. by steam stifling of cocoons which retains moisture in the cocoon shell facilitating wetting of shell before cooking, followed by treatment at boiling temperature in a single pan, which is high permeation temperature treatment. This is followed by transferring the cocoons immediately to reeling basin (after brushing in cooking pan itself), which facilitates low permeation temperature treatment. Though the sequence of operations matches with the permeation treatment, there is a lot of time gap between the processes and the comparison is only for facilitating proper understanding [Hariraj (2002)].

COOKING TREATMENT

The cocoons are subjected to cooking treatment after the pre-treatment processes i.e. retting, high temperature for permeation and low temperature for permeation. The cooking treatment is of extreme importance since it decides the quantity of water absorbed into the cocoon (semi-sunken / sunken system of reeling), waste production level, sericin swelling level adjustment, quality of raw silk reeled etc., The cooking treatment is followed by the adjustment and finishing treatment. During the adjustment treatment, cold water is added to the cooking bath, so that temperature of the bath is gradually reduced to facilitate maximum water penetration into the cocoons. Further, the pattern of reducing the temperature should be such that the sericin hardening effect throughout the cocoon shell should be uniform. After adjustment treatment, the cooked cocoons are stored (finished) at about 30-40° C temperature before being taken for brushing operation [Kinoshita *et al.* (1980 and 1982b)].

In automatic reeling machines, the cooked cocoons are brushed automatically and transferred to the reeling basin. The waste generated in automatic reeling machine tends to be on the higher side when compared to multiend reeling technology. Various researchers have reported cooking techniques suitable for automatic reeling with an objective of producing high quality silk, better raw silk recovery along with reduced silk waste generation. Cooking technology was developed with a view to improve quality of raw silk at the same time for reducing silk waste generation. Cooking technology was developed with a view of improving quality of raw silk at the same time of reducing silk waste. Nakagawa (1932) developed a cooking technology involving pre-treatment, cooking at 98° C for about 2 minutes with gentle boil, followed by adjustment and finishing. This method improved raw silk percentage and reduced the cleanness defects of raw silk.

Koike (1964a, 1964b, 1965, 1966a, 1966b, 1967) and Koike *et al.*, (1969, 1970) suggested pre-treatment of cocoons and its influence on water absorption into the cocoon and moisture content in the shell. This pre-treatment of cooking influenced the cooking, reeling parameters and raw silk quality. Further, he studied the effect of air pressure on the water permeation in the cocoon shell and on heat transmission medium and developed cocoon cooking technology. Shimazaki and Yoshizawa (1952, 1953a, 1953b), Shimazaki *et al.*, (1962b, 1962c) and Shimazaki (1973, 1977, 1983) carried out a series of systematic studies to understand the process of cocoon cooking. In his studies he focused

on improvement of raw silk recovery and put forward the concept of V-type conveyor cocoon cooking machine in which the retting, permeation, steam cooking and adjustment temperatures could be controlled so that the parameters for different quality cocoons could be set. Okamura *et al.*, (1954 and 1955) reported a cooking technique employing infrared heating in the cooking part. Further, Koewae (1959 and 1960) repositioned the infrared rays emitting system and made air to pass through infrared emitting system into the steam cooking part, so that high temperature could be achieved for suitable cocoon cooking. Moriee (1942 and 1959) reported cooking technique by using low temperature treatment in the retting zone. He further studied the extent of water entering the cocoons during the retting and permeation process and its influence on cooking process and adjustment process.

Ono (1973, 1976a, 1976b) studied the kinetics of cooking with reference to water permeation in the cocoon shell and the duration of cooking. In this method of cooking, while time reduced and raw silk percentage and colour of the silk improved, quality of raw silk decreased with more thread troubles. Katsuno (1983, 1985) studied cooking temperature and time against cocoon shell water content and moisture content and developed a cooking technique suitable for inferior quality cocoons having poor reelability.

It is reported by Shimazaki (1986), Koike (1972) that shell sericin dissolved in hot water after 90° C drastically with increase in temperature and observed that at around 100° C, one degree temperature increase resulted in maximum sericin dissolution and over softening of the sericin layer. If water is either hot or boiling, there will be a lot of heat transfer to the cocoon shells, which will lead to over softening of cocoon shell. Further, if pressure treatment is given, higher temperatures can be achieved and over softening of shell layer can be avoided. If the cocoons are treated at about 100° C for long periods over softening of shell takes place. Therefore, when the cocoons are entered in the adjustment part, the treatment time should be lowered. Hence, in the adjustment part sudden decrease in temperature is advisable in order to avoid over softening of outer layers of cocoon shells. Thus, the basis of cocoon cooking technology is decided by cocoon shell water absorption and heat transmission medium.

The inner layer cooking is not achieved during permeation treatment, but achieved in cooking and adjustment treatments. Thus the available literature clearly confirms that complete cooking process consisting of retting, permeation, cooking, adjustment along with suitable temperature and duration selection improves the productivity and quality of raw silk.

REELING PERFORMANCE

In silk reeling the following points i.e. cocoon quality factors related to cooking, finding the most suitable cooking technology based on cocoon quality and carrying out the same on day to day basis and process control, are the basic requirement for effective running. Process control would be difficult when cocoon qualities are different and small lots are mixed. In order to overcome the above problems, the technology / expertise available with the people was accumulated in the computer as data base and using the above information an expert system was developed in Japan [Kinoshita and Tajima (1990)], Kinoshita *et al.* (1993a, 1993b) to enable the filatures to utilise the same to improve cocoon cooking efficiency.

In order to arrive at the optimum cooking conditions, raw silk percentage is an important factor [Shimazaki (1986)]. Over softening of cocoon shell leads to more sericin dissolution and waste generation during reeling operations and raw silk production would be reduced. Hence all layers of cocoon shell should be uniformly softened. Further, both under cooking and over cooking increased the waste percentage. Generation of waste during first brushing of the cooked cocoons has direct relation to raw silk percentage. If the waste generation increased by 1 per cent, then the raw silk production decreased by 3 percent [Shimazaki (1961a)]. Further, thread troubles, waste generation and pelade layer thickness influence raw silk percentage. Therefore, reduction in waste percentage alone will not improve raw silk recovery because there would be sericin dissolution during cooking.

Cooking part temperature influences the swelling of cocoons, outer layer dropped cocoons and swelling of shell. However, there is no significant relation with inner layer dropped cocoons. Temperature of reeling basin should therefore be increased to reduce the inner layer cocoon dropping. Shimazaki (1986) reported the importance of cooking zone temperature and time on achieving increased quality output. He further emphasized that cooking temperature selection critically decides sericin dissolution and quality characteristics of raw silk.

Thus in order to realise better output of cocoons, both drying, suitable cooking in association with appropriate reeling process shall be adopted for improving the reeling performance and quality of raw silk produced.

WATER CHARACTERISTICS

Water also plays a vital role, in achieving swelling of cocoons with hard shells. By reducing the pH, M-alkalinity in the cooking water, softening and swelling of hard cocoon shell could be achieved. The water treated using H cycle influences the cooking of cocoons, thus reducing the reelability and raw silk percentage and increasing the pelade layer and waste percentage. Shimazaki (1986) reported that M-alkalinity if reduced below 10 ppm, pelade layer waste would be increased. Further, Ogihara (1956) has established a correlation between H cycle water, pH and sericin solubility. He has indicated that, if pH is around 4.2, sericin solubility will be minimum. He also indicated that in natural water there is no relation between pH and sericin solubility, however high correlation exists between conductivity and sericin solubility.

The hot water above 90° C drastically dissolves the shell sericin and around 100° C, maximum sericin dissolution takes place resulting in over softening of sericin in cocoon layers. The hot water having more bubbles during cooking treatment increases the heat transfer to the cocoon shells, which will lead to over softening of cocoon shell. However, if pressure treatment is given the bubbles in the hot water will be reduced (as high temperature can be achieved due to pressure), the over softening of shell layer will not be there [Shimazaki (1986), Koike (1972)].

When the cocoons are treated at 100° C for a long period in cooking treatment, it over softens the shell. Hence, in adjustment part sudden decrease in temperature is advisable in order to avoid over softening of outer layers of cocoon shells. Thus, the basis of cocoon cooking technology is decided by cocoon shell water absorption and heat transmission medium and the water qualities like, pH, M-alkalinity, hardness, etc. has also a bearing on the technology of cooking [Kinoshita (1997)].

Yamada (1962, 1963a) and Miyauchi (1979) reported that M-alkalinity has relation with reelability of cocoons and hardness is related to pelade weight and sericin loss percentage. Bito (1973) studied the water characteristics available in various filatures in Japan and characterised sericin chemistry and its relation. From his studies, it was found that M-alkalinity has maximum relation with sericin solubility. Yamada (1963b, 1967) studied the water quality which easily dissolved the sericin and difficult to dissolve sericin (tightly holding the cocoon layers). They also studied the influence of H cycle water treatment on cooking of cocoons. From the above studies, it was found that for automatic reeling process the water permeation and infra-red heating used in cooking methodology reduced the sericin solubility, improve the raw silk percentage and increase the loose end and cleanness defects, thus reduce the cleanness quality of raw silk. With respect of quality of raw silk a balance has been obtained between cleanness defects and raw silk percentage using the proper cooking technology.

CONCLUSION

Thus from the above studies it could be concluded that cocoon quality plays a significant role for production of quality silk in association with cooking process parameters. The cooking of the cocoons is the heart of the reeling operation and hence unless carefully handled it will lead to disaster results.

The cooking parameters for each lot of cocoons shall be suitably selected on day-to-day basis to achieve desired results. Quality based sale of raw silk would facilitate adoption of proper cooking technology in silk filatures.

REFERENCES

- BITO SHOZHO (1973) Quality examination related to cocoon shell sericin solubility in the water used for reeling, *Journal of National Institute of Sericultural Science*, 25: 371-583.
- CHIBA (1927) Cocoon cooking equipment permeation type, Patent no.14298.
- HARIRAJ G. (1994) Technical report on bivoltine silk production technology, Report submitted to Central Silk Board, Bangalore and JICA, Japan, 67-81.
- HARIRAJ G. KINOSHITA H (1994) Studies on bivoltine cocoon cooking: Effect of time and temperature of retting on absorption and moisture content in Indian and Japanese cocoons, *Sericologia*, 34(3): 497-506.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H., LAKSHMIPATHAIAH B. N. (1997a) Studies on multi-bivoltine cocoon cooking: Part I: Effect of stifling, temperature and duration of cooking on water penetration in multi-bivoltine cocoons, *Sericologia* 37(4): 739-744.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H., LAKSHMIPATHAIAH B. N. (1997b) Studies on multi-bivoltine cocoon cooking: Part II. Effect of stifling temperature and duration of cooking on reeling and quality characteristics, *Sericologia*, 37(4): 749-757.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H., (2002a) Studies on multibivoltine cocoon cooking: Part I: Effect of retting treatment in pan cooking on water absorption characteristics, *Indian J. Sericulture*, 41(2): 130-136.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2002b) Studies on multibivoltine cocoon cooking: Part. II. Effect of retting and permeation treatments in pan cooking on water absorption characteristics, *Indian J. Sericulture*, 41(2): 137-144.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2002c) Studies on multibivoltine cocoon cooking: Part III. Effect of cooking and adjustment treatments in pan cooking on water absorption characteristics, *Indian J. Sericulture*, 41(2): 145-152.
- HARIRAJ G. SOMASHEKAR T. H. (2002a) Studies on cooking of multibivoltine cocoons: Part. I: Effect of retting treatment in pan cooking on colour diffusion in cocoon shell, *Sericologia*, 42(4): 513-250.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2002b) Studies on cooking of multibivoltine cocoons: Part II. Effect of retting and permeation treatments in pan cooking on colour diffusion in cocoon shell, *Sericologia*, 42(4): 525-532.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2002c) Studies on cooking of multibivoltine cocoons: Part. III: Effect of cooking and adjustment treatments in pan cooking on colour diffusion in cocoon shell, *Sericologia*, 42(4): 537-544.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2002) Studies on multibivoltine cocoon reeling: Influence of permeation treatments in cooking on reeling characteristics, *J. China Textile Institute*, 12(2): 82-101.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2002) Studies on efficacy of cocoon cooking using colour diffusion in different layers of Indian multi-bivoltine cocoon shell, *Man-made Text India*, XLV(12): 477-480.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2002) Studies on multi-bivoltine cocoon reeling: Part I. Combined influence of drying, cooking and reeling on reeling characteristics of Indian multi-bivoltine cocoons, *Asian Text. J.* 11(12): 82-86.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2003) Studies on multi-bivoltine cocoon reeling: Part II. Combined influence of drying, cooking and reeling processes on quality characteristics of Indian multi-bivoltine cocoons, *Asian Text. J.* 12(3): 84-89.

- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2003) Studies on multi-bivoltine cocoon cooking: Effect of pressurised cooking conditions on reeling and quality characteristics, *Acta Sericologia Sinica* (Canye Kexue), 29(4): 391-398.
- HARIRAJ G., SOMASHEKAR T. H. (2004) Influence of cooking and adjustment treatments on reeling and quality characteristics of raw silk, *Indian Journal of Fiber and Textile Researcher*, 29(6): 207-217.
- HARIRAJ G. (2002) Studies on thermo mechanical treatments in drying and cooking of Indian multi-bivoltine cocoons and their influence on quality of raw silk, PhD thesis submitted to Faculty of Technology Bangalore University, India: 42-52.
- HIASHI T. (1935) Test examination related to reeling tension, *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 8(1): 272-285.
- KATSUNO M. (1969) The effect of pre-treatment temperature and time before cooking on cocoon shell moisture and its variability, *Journal of Sericultural Science Institute*, 17: 20-26.
- KATSUNO M. (1973) The cocoon shell water absorption based on low pressure permeation treatment, *Journal of Sericultural Science Institute*, 22: 51-60.
- KATSUNO M. (1974) Neglecting after the low permeation treatment and studying the effect on cocoon shell moisture absorption, *Journal of Sericultural Science Institute*, 23: 37-41.
- KATSUNO M., MASAGO MASUMOTO T., (1978) In regard to reelability improvement based on pre-treatment before cocoon cooking, *Journal of Sericultural Science Institute*, 27: 25-30.
- KATSUNO M. (1983) Improvement of cocoon cooking technology by examining the facts of the filature, *Filature summer seminar – Report*, 36: 24-35.
- KATSUNO M. (1985) Investigations / examinations related to cocoon cooking methods, *Journal of Sericultural Science Institute*, 33: 21-122.
- KINOSHITA H., WATESE H., SUGENUMA Y. (1979) Studies on the systematization of cocoon cooking I: On the analysis of the reeling characteristics by multivariate analysis, *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 48(5): 404-410.
- KINOSHITA H., WATESE H., SUGENUMA Y. (1980) Studies on the systematization of cocoon cooking II: On the optimization of cocoon cooking by temperature patterns, *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 49(3): 352-358.
- KINOSHITA H., KUSAMA T., KOEKE R., (1982a) Studies related to cocoon pre-treatment before cooking, *Filature and Silk Conference report*, 32: 10-13.
- KINOSHITA H., TAJIMA F., WATESE H. (1993a) Studies on the systematization of cocoon cooking – Application of fuzzy expert system, *Sericologia*, 33(1): 141-146.
- KINOSHITA H., TAJIMA F., WATESE H. (1993b) On the optimisation of cocoon cooking, Paper presented during the second International Conference – The collection of papers : 141-146.
- KINOSHITA H., TAJIMA F., MIYAJIMA T., SIMADA M. (1993c) Studies on the systematization of cooking – On the optimization of cocoon cooking by the application of reeling tension of thread, *The Journal of Silk Science Tech. Japan*, 2: 1-6.
- KINOSHITA H., TAJIMA F. (1994) Studies on the systematization of cocoon cooking: On the soaking treatment and permeability of cocoon shell, *The Journal of Silk Science Tech. Japan*, 3: 7-11.
- KINOSHITA H. (1997) Development of optimum control method of cocoon cooking by the application of expert system, *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, 19(10): 1-119.
- KOMATSU K. (1975) Studies related to sericin solubility and structural features, *Journal of National Institute of Sericultural Science*, 26: 136-256.
- KOIKE R., MARUYAMA Z. (1954) In regard to cocoon shell swelling and cocoon volume relation, *Cocoon testing research studies report*, 13: 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*, 13: 28-33.
- KOIKE R. (1963b) Studies on the pre-treatment before cooking II: Relation between brushing and thread troubles, *Filature and Silk Conference Report*, 13: 34-40.
- KOIKE R. (1963b) Studies on the pre-treatment before cooking III: In regard to raw silk quality, *Filature and Silk Conference Report*, 13: 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, 14: 20-26.
- KOIKE R. (1964a) 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, 14: 20-26.
- KOIKE R. (1964b) In regard to cocoon shell water quantity variations in the pre-treatment before cooking II. Steam permeation and low permeation relations, Filature and Silk Conference Report, 14: 27-33.
- KOIKE R. (1965) Studies on the pre-treatment before cooking: In regard to steam treatment of cocoon permeation, Filature and Silk Conference Report, 13: 28-33.
- KOIKE R. (1966a) Studies on the pre-treatment before cooking. In regard to steam treatment for cocoon permeation, Bull. Nagano Pref. Textile Experiment Station Report, 40: 32-33.
- KOIKE R. (1966b) Studies on the pre-treatment before cooking. In regard to hot water and steam treatment for cocoon permeation, Bull. Nagano Pref. Textile Experiment Station Report, 40: 33-34.
- KOIKE R. (1967) Recent cocoon cooking methods and its points of problems, Filature summer seminar – Report, 20: 30-31.
- KOIKE R., YOSHI T., EIKIKO I. (1969) In regard to cocoon cooking, raw silk boil-off loss and elongation, Filature and Silk Conference Report, 19: 24-27.
- KOIKE R., YOSHI T., EIKIKO I. (1970) Synchronisation of each process of cocoon cooking and its influence on reeling parameters, Bull. Nagano Pref. Textile Experiment Station Report, 44: 39-42.
- KOIKE R. (1972) Reeling industry productivity improvement using proper cooking technology, Reeling management technology training textbook, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan, 25.
- KOIWAE (1959) In regard to cocoon cooking suitable for automatic reeling machine, Filature Summer Seminar – Report, 12: 18-23.
- KOIWAE (1960) In regard to cocoon cooking using vacuum cooking method, Journal of Silk Technology, 6: 6-10.
- MORIEE K. (1942) In regard to recent cocoon cooking technology, Journal of Raw Silk, 1: 12-14.
- MORIEE K. (1959) In regard to cocoon cooking for automatic reeling machine, Filature Summer Seminar – Report, 12: 25-28.
- MIYAUCHI K., CHIYAKO K. (1979) In regard to water quality adjustment reeling process, Filature and Silk Conference Report, 29: 73-76.
- OGIHARA K. (1956) In regard to water used for cocoon cooking, Filature and Silk Conference Report, 6: 125-130.
- OKAMURA G., TAKEGAWA H., KOIWAE M. (1954) Studies related to cocoon cooking machine, Filature and Silk Conference Report, 4: 117-119.
- OKAMURA G., TAKEGAWA H., KOIWAE M. (1955) Cocoon cooking method by using softening agent and infra-red rays”, Filature and Silk Conference Report, 5: 207-208.
- OKI (1955) Denier indicating device, Patent no. 30-6605.
- OKU M. (1940a) Studies on physical and chemical science of mulberry cocoons i.e., *Bombyx mori*, The Journal of Sericultural Science of Japan, 11(3): 219-220.
- OKU M. (1940b) Physical Science of sericin, The Journal of Sericultural Science of Japan, 11(5): 161-170.
- ONO T. (1973) Studies on cocoon cooking method for automatic reeling machine”, Nissan Company Textile Department Report, Tokyo, 175.
- ONO T. (1976, a) Trends in demand of silk and its concerned reeling technology available, Filature and Silk Conference Report, 26: 155-164.
- ONO T. (1976b) Recent reeling technology available with respect to raw silk quality, Filature Summer Seminar – Report, 30: 34-74.

- NAKAGAWA S. (1932) Cocoon cooking method with low temperature boiling conditions after steam permeation, *J. Seri. Sci. Jpn*, 14(7): 43-56.
- NAKAYAMA N. (1974) Relationship between size of the cocoon and water permeation inside the cocoon, *Bull. Nagano Pref. Text. Res. Institute*, 8: 54-57.
- OGIHARA K. (1933) Comments on cocoon cooking: *Cooking theory book* Bunmeido, Tokyo, 348-354.
- SHIMAZAKI A., YOSHIKAWA I. (1952) The influence of temperature and time in cooking treatment process, *Filature and Silk Conference Report*, 2: 63-65.
- SHIMAZAKI A., YOSHIKAWA I. (1953a) Analysis of cocoon cooking process based on estimation I. Regression correlation between number of casting and treatment duration, *Filature and silk conference report*, 3 : 119-125.
- SHIMAZAKI A., YOSHIKAWA I. (1953b) Analysis of cocoon cooking process based on estimation I. Regression correlation between section wise number of casting and treatment duration, *Filature and Silk Conference Report*, 3: 126-139.
- SHIMAZAKI A. (1961a) Study related to statistical management method in reeling process – I. Management on fixed number cocoon reeling process and II. Establishing raw silk size control management standard in automatic reeling machine fixed size type, *Filature and Silk Conference Report*, 16: 403-603.
- SHIMAZAKI A., SEKIJIMA (1961b) Study on pre-treatment of cocoon cooking I. Soaking temperature, time, volume and cocoon shell moisture percentage, *Filature and Silk Conference Report*, 11: 1-8.
- SHIMAZAKI A., YAMAMOTO A. (1962a) Study on pre-treatment of cocoon cooking II. Soaking treatment and cocoon shell permeability, *Filature and Silk Conference Report*, 12: 4-7.
- SHIMAZAKI A., OSAN, TAKENAGA (1962b) Cocoon treatment and raw material uniformity I. Cocoon getting crushed during cooking process, *Filature and Silk Conference report*, 12: 8-11.
- SHIMAZAKI A., SEKIJIMA K., FURUYAMA (1962b) Cocoon treatment and raw material uniformity II.: Pelade waste distribution, *Filature and Silk Conference Report*, 12: 12-17.
- SHIMAZAKI A. (1964) *Filature technology lecture*, Published by Sericultural Association, Tokyo, 89.
- SHIMAZAKI A., KONO, UCHIDA SAITO (1966) Analysis of cocoon cooking trend in cocoon cooking process. I. Features of light and heavy permeation treatment and steam cooking, *Filature and Silk Conference Report*, 16: 54-57.
- SHIMAZAKI A. (1973) *Management engineering manual*, Published by Agricultural Statistics Association, Tokyo, 291.
- SHIMAZAKI A. (1977) Problems related to Japan reeling technology and decreasing of cocoon production, *Filature Summer Seminar – Report*, 30: 34-54.
- SHIMAZAKI A. (1983) Subject task force of future reeling technology, *Filature summer seminar – Report*, 36: 43-62.
- SHIMAZAKI A. (1986) Recent technology counter measures for avoiding yarn defects, *Filature Summer Seminar – Report*, 39: 1-14.
- SHIMIZU S. (1997) Report on the silk reeling – Bivoltine sericulture technology development program, *Central Silk Board, Bangalore*, 1-15.
- SONWALKAR T. N. (1982) A technical report on silk industry in Japan, Submitted to Central Silk Board, Bangalore 32-39.
- SUBHAS V. NAIK, SOMASHEKAR T. H. (2003a) Studies on bivoltine cooking. Part I. Effect of retting temperature and permeation treatment condition on reeling performance of Indian bivoltine cocoons, *Sericologia* 43(2): 215-225.
- SUBHAS V. NAIK, SOMASHEKAR T. H. (2003b) Studies on bivoltine cooking. Part II: Effect of retting temperature and permeation treatment condition on quality characteristics of bivoltine cocoons, *Sericologia*, 43(2): 235-244.
- SUBHAS V. NAIK, SOMASHEKAR T. H. (2003a) Studies on bivoltine cooking. Part I: Effect of cocoon cooking (swelling) treatment and adjustment treatment on cocoon cooking degree and water content in cocoon shell of Indian bivoltine hybrid cocoons, *Sericologia*, 43(3): 369-375.

- SUBHAS V. NAIK, SOMASHEKAR T. H. (2003b) Studies on bivoltine cooking. Part II. Effect of cocoon cooking (swelling) treatment and adjustment treatment on reeling performance of Indian bivoltine hybrid cocoons, *Sericologia*, 43(3): 381-391.
- SUBHAS V. NAIK, SOMASHEKAR T. H. (2003c) Studies on bivoltine cooking. Part III. Effect of cocoon cooking (swelling) treatment and adjustment treatment on quality characteristics of Indian bivoltine hybrid cocoons, *Sericologia*, 43(2): 399-410.
- SUBHAS V. NAIK, SOMASHEKAR T. H. (2004) Influence of spinning conditions on reeling performance and quality of raw silk, *Indian Journal of Fiber and Textile Research*, 29(9): 324-332.
- YAMADA (1962) Study on water used for reeling (Report II) – Relation between water quality used for different work and reeling results, *Journal of Sericultural Science Institute*, 10: 79-98.
- YAMADA (1963a) Study on water used for reeling (Report III) Significance of hardness in the water used for reeling, *Journal of Sericultural Science Institute*, 11: 16-24.
- YAMADA (1963b) Water quality adjustment in cooking process, *Filature Summer Seminar – Report*, 13: 60-64.
- YAMADA (1967) Management of water used for reeling, *Filature Summer Seminar – Report*, 19: 140-143.
- YAMAMOTO A. (1917) Semi sunken cocoon cooking method, *Seishi no Tomo* book published in Japan.

REVUE SUR LA TECHNOLOGIE DE CUISSON DES COCONS

G. HARIRAJ*, HARUO KINOSHITA & T. H. SOMASHEKAR

1. Central Silk Technological Research Institute, BTM Layout, Bangalore – 560 068, Inde.
2. National Institute of Sericultural and Entomological Science, Matsumoto, Japon 390-0812.

La cuisson du cocon est le cœur du processus de dévidage. Il est difficile de standardiser les paramètres du processus de cuisson pour les directeurs de filature afin d'obtenir une bonne performance de dévidage et une soie grège de qualité. Nous passons en revue les études entreprises jusqu'à présent sur la technologie de cuisson pour mieux comprendre les technologies ainsi que pour les adopter dans les filatures de soie.

INTRODUCTION

Le mécanisme de cuisson dépend en gros de plusieurs facteurs comme les caractéristiques des cocons, les caractéristiques de la séricine, les caractéristiques de l'eau. La qualité et les caractéristiques de la séricine varient considérablement en fonction de la race du ver à soie, des conditions d'élevage, du séchage du cocon et des conditions de stockage etc., [Hariraj (1994)]. Pour amollir la séricine correctement, on procède à la cuisson des cocons. La cuisson des cocons est un processus par lequel on fait pénétrer de l'eau de l'extérieur à l'intérieur et de l'intérieur à l'extérieur de la coque soyeuse de manière à amollir la séricine uniformément dans toute la coque soyeuse de sorte que le filament de soie se déroule facilement jusqu'à la fin sans rupture. Le mécanisme de cuisson du cocon se divise en quatre étapes, c'est à dire le pre-traitement avant la cuisson, le pre-traitement pour la cuisson, le traitement de cuisson et le traitement d'ajustement. Les détails concernant chaque traitement sont présentés dans le Tableau I [Kinoshita (1997)].

Dans le dévidage de la soie, la productivité et la récupération de soie grège (quantité) dépendent principalement de la technologie de cuisson [Shimazaki (1964)]. La cuisson des cocons entraîne l'amollissement des couches de séricine et de l'agglutination entre les couches du cocon, en utilisant l'eau et la vapeur. La séricine gonfle et s'amollit de sorte que l'agglutination des filaments est libérée pendant le dévidage sans rupture et sans dégâts. La technologie utilisée pour la cuisson consiste à transformer les couches du cocon et à amollir la séricine de sorte que les points d'agglutination se libèrent [Kinoshita et coll., (1982a)].

La température de cuisson de 80° - 90° C gonfle et amollit correctement la séricine aux points de croisement des filaments de cocon pour obtenir un meilleur dévidage. Cependant, si la température augmente au-delà de 90° C, la dissolution de la séricine augmente en flèche comme l'ont rapporté Oku (1940b) et Shimazaki (1964). L'effet de la température de l'eau de cuisson sur la solubilité de la séricine est présenté dans la Figure 1.

Komatsu (1975) a étudié la solubilité de la séricine et sa relation aux propriétés structurales en utilisant les rayons ultra violet ainsi que la température de l'eau chaude. On a estimé le pourcentage de quatre types de séricine rapportées être présentes dans la soie grège. De plus, on a établi la relation entre la séricine de la coque soyeuse et la solubilité de la séricine de différents types de séricine. On

* Auteur auquel adresser la correspondance.

observe que la coque soyeuse comporte de la sérécine facilement soluble dans la couche externe tandis que la couche interne est difficile à solubiliser. Quand on cuit les cocons à 100° C sans suivre un profil de température, la couche externe de la sérécine de la coque soyeuse gonfle facilement et s'amollit, ce qui entraîne une génération de déchets importante, et diminue donc le pourcentage de soie grège. Cependant, si on cuit correctement les cocons en suivant des profils de température adaptés, la variation de cuisson dans les couches de coque cuite est minimum, ce qui entraîne un meilleur pourcentage de soie grège, moins de défauts de propreté, moins de cocons cassés et une agglutination uniforme du fil. De cette manière, le fil se libère facilement des cocons [Shimazaki (1961a)].

Kinoshita et coll., (1989) ont décrit la théorie impliquée dans le processus de cuisson du cocon comme un phénomène de succion entrée. Les détails sont présentés dans le Tableau II.

Kinoshita et Tajima (1990) ont de plus établi que, quand les cocons sont dans une condition sèche, l'air passe par la coque soyeuse mais l'eau ne pénètre pas facilement. Cela se produit parce que la coque soyeuse sèche développe un caractère d'imperméabilité à l'eau en surface de la coque en raison du traitement à la chaleur reçu au cours du processus de séchage. Dans les cocons mouillés, l'eau passe facilement par la coque soyeuse mais l'air ne pénètre pas, puisque la sérécine lorsqu'elle gonfle pendant le traitement d'humidification bloque les pores de la coque. On utilise cette théorie à chaque stade de cuisson du cocon pour obtenir une pénétration correcte de l'eau dans les cocons.

Les divers types de méthodes de cuisson du cocon sont : à la bassine ouverte, à deux bassines, à trois bassines, la cuisson pressurisée stationnaire et la cuisson pressurisée à convoyeur.

PROCESSUS DE CUISSON DU COCON A LA BASSINE OUVERTE

La cuisson à la bassine ouverte est le processus de traitement de cuisson à une température unique dans une bassine unique pendant une courte durée, dans le seul but de regrouper les bouts des cocons. Bien que cette méthode soit populaire dans l'industrie indienne du dévidage, elle ne conduit qu'à une productivité et une qualité faibles. La conception des dévideurs est qu'une fois que les cocons sont placés dans de l'eau chaude dans la bassine de cuisson, les cocons cuisent et on peut prélever les véritables extrémités des cocons. Ils supposent aussi que le processus de cuisson est terminé avec un traitement à température unique. En raison de la nature inhérente des cocons indiens, les cocons donnent un fil même avec un traitement à température unique. Cependant, le processus de cuisson ne fait que commencer et le traitement ultérieur des cocons est essentiel pour cuire les couches de la coque soyeuse efficacement mais les filateurs ne comprennent pas cela.

On procède à la méthode de cuisson à la bassine de 80° à 90° C pour gonfler la sérécine. Cependant, le cocon ne cuit pas correctement en raison de la sur-cuisson des couches externes et de la sous-cuisson des couches internes, ce qui diminue donc la dévidabilité et augmente la génération de déchets. De plus, les cocons flottent à la surface de l'eau pendant le dévidage, par conséquent on ne peut pas maintenir un nombre constant de cocons opérationnels au cours du dévidage, ce qui a un effet sur le titre de la soie grège produite. Hariraj et coll., (1997a) ont étudié l'effet de la température et de la durée de la température de cuisson à la bassine ouverte sur l'absorption de l'eau à l'intérieur du cocon et de la coque ainsi que sur la performance de dévidage et sur la qualité de la soie grège des cocons poly-bivoltins Indiens.

PROCESSUS DE CUISSON DES COCONS DANS DEUX A TROIS BASSINES

La méthode de cuisson dans deux bassines a d'abord été adoptée au Japon. La cuisson dans deux bassines permet d'obtenir des températures différentes en manipulant l'apport de vapeur pour convenir aux différentes qualités de cocons. Sonwalkar (1982) a réalisé des études sur les méthodes de cuisson dans trois bassines en adoptant des profils de température avec la méthode faible – élevée – faible et élevée – faible – élevée. Il a estimé que le profil de température faible – élevée – faible donne de meilleurs résultats par comparaison au profil de température élevée – faible – élevée pour

la cuisson des cocons bivoltins Japonais. Hariraj et Somashekar (2002a, b, c, 2002 a, b, c, 2002a, b, c, 2002, 2002, 2003, 2004) ont standardisé la température de rouissage, la température d'imprégnation, la température de cuisson et la température d'ajustement et les durées à adopter avec la cuisson dans deux bassines chez les cocons poly-bivoltins indiens en utilisant l'absorption de l'eau dans le cocon et la coque, la diffusion de la couleur dans les coques soyeuses ainsi que la performance de dévidage et la qualité de la soie grège. Dans les conditions indiennes, les méthodologies de cuisson dans deux / trois bassines sont en cours de diffusion pour améliorer la performance de cuisson par comparaison à la technologie de cuisson dans une bassine ouverte.

PROCESSUS DE CUISSON PRESSURISÉE DES COCONS

La technologie de cuisson pressurisée consiste en deux dispositifs c'est à dire, la machine de cuisson pressurisée circulaire stationnaire et la machine de cuisson automatique à convoyeur. La machine de cuisson pressurisée circulaire stationnaire est appelée modèle Oshita au Japon et ce modèle est maintenant populaire dans l'industrie de dévidage de la soie en Inde [Shimizu (1997)]. Hariraj et Somashekar (2003) ont standardisé les conditions de cuisson pressurisée pour les cocons poly-bivoltins indiens. Subhas V. Naik et Somashekar (2003a, b, 3003a, b, c, 2004) ont standardisé la température de rouissage, la température d'imprégnation, la température de cuisson et la température et les durées d'ajustement à adopter avec la cuisson pressurisée chez les cocons hybrides bivoltins indiens élevés dans des conditions différentes de température et d'humidité. Les méthodologies adoptées avec les deux types de machines de cuisson pressurisée sont presque les mêmes, cependant avec la machine de cuisson pressurisée circulaire stationnaire, la limitation est qu'il faut utiliser des profils étendus de variation de la température. La machine de cuisson avec convoyeur permet d'obtenir des résultats de cuisson et une performance de dévidage meilleurs [Kinoshita et coll., (1993a)]. Dans les conditions indiennes, quels que soient les dispositifs de dévidage utilisés, il faudrait se préoccuper de la technologie de cuisson et de la sélection des températures et de durées de cuisson adaptées, en fonction de la qualité des cocons.

HISTORIQUE

En fait, on peut cuire les cocons légèrement (sous-cuisson) à température élevée pour amollir la séricine et obtenir les extrémités des cocons. On procède à cette méthode de cuisson à la bassine de 80° à 90° C pour gonfler la séricine de sorte que le pourcentage de soie grège augmente. En 1886, ces types de cuisson ont été adoptés jusque dans 80 % des filatures au Japon. Les cocons ne sont pas correctement cuits, à cause de la sous-cuisson, de sorte que les déchets de production augmentent et la dévidabilité diminue. Ce processus aide aussi à dévider les mauvais cocons puisqu'il n'y a pas d'eau qui pénètre à l'intérieur de sorte que la productivité et le pourcentage de soie grège augmentent. Cependant, les cocons placés dans la bassine de dévidage influencent le maintien des cocons par le fileteur et cela a un effet sur le titre de soie grège produite. Selon le gonflement de la séricine et la variation de la cuisson, les défauts seront plus importants et cela a un effet sur la qualité. Cependant, la gestion de la filature était bonne avec un rendement amélioré.

En 1901, les besoins en exportations pour New York ne pouvaient pas être satisfaits par l'Europe. Pendant cette période, on importait beaucoup la soie de Chine et du Japon, qui était adaptée pour la chaîne. La soie japonaise avait un titre très régulier et de très bonnes caractéristiques de cohésion, appréciés par les Américains. Pendant la même période au Japon, on a mis au point un système de dévidage submergé. Ce système de cuisson amollit la coque uniformément et une quantité maximum d'eau peut pénétrer à l'intérieur du cocon, ce qui fait plonger les cocons dans l'eau. Pour séparer les cocons opérationnels des cocons cassés, le système submergé est très adapté et on voit clairement le nombre de cocons dévidés et le fileteur est capable de maintenir le nombre de cocons selon le titre désiré et de produire une soie grège avec une bonne régularité de titre. De plus, cela améliore la

cohésion ainsi que la productivité du dévidage de la soie. Cependant, pour procéder au système de dévidage submergé, il était devenu nécessaire d'inventer la machine de cuisson adaptée. Ainsi, pendant cette période l'opération de cuisson était séparée de l'opération de dévidage. La qualité de la soie grège ainsi produite était bien meilleure et adaptée pour le fil de chaîne.

En 1911, la qualité de la soie grège produite au Japon était bien acceptée par le marché et était aussi mieux payée. Pendant la période, le *National Institute of Sericultural and Entomological Science* a été établi et la recherche et la formation dans la technologie du dévidage ont pu démarrer. On a introduit la technologie chez les filateurs dans divers endroits du Japon et on a procédé à des formations bénéfiques. L'objectif de la formation était d'obtenir la production d'une qualité de soie grège pour la chaîne en utilisant la dernière technologie de cuisson et de dévidage. Cette technologie était capable d'amollir la sérécine de la coque d'une manière adaptée et d'humidifier complètement les cocons. Cependant, cela diminuait le pourcentage de soie grège par comparaison à la cuisson dans une bassine. De plus, cette technologie entraînait une variation de la couleur de la soie pendant la production puisque les cocons tachés étaient dévidés dans la même bassine, ce qui affectait la qualité de l'eau pendant le dévidage [Kinoshita (1997)].

De plus, Yamamoto (1917) a mis au point un processus, qui est appelé système semi-immergé. Ce système de dévidage se situe entre le système flottant et le système immergé de dévidage et il améliore le pourcentage de soie grège et la productivité, il est meilleur que le système de dévidage complètement immergé. Ainsi, en utilisant la technologie de cuisson, on améliore la qualité comme la productivité et ainsi de nombreuses filatures ont commencé à utiliser cette technologie. En 1918, il n'y avait pas de filature utilisant cette technologie en 1924, 47 % des filatures avaient adopté cette technologie et en 1927, 57 % l'avaient adoptée. Bien que la qualité et la productivité aient été améliorées dans la filature, du point de vue de la gestion, on a fait du rendement en soie grège un objectif important, puis par la suite, on a fait des trois facteurs des objectifs pour la filature. Les filatures ont commencé à mettre au point les technologies adaptées pour les obtenir. Le Japon a pu exporter de la soie grège pour la chaîne pendant une très longue période. Cependant, l'Amérique a lentement commencé à utiliser de la soie dans les chaussettes et les exportations ont augmenté d'autant. Cela a entraîné des problèmes dans la régularité de la soie grège produite, comme on pouvait le voir avec les chaussettes. Il a donc fallu encore améliorer la qualité. Ainsi, la vitesse de dévidage qui était de 200 mpm (mètres par minute) est tombée à 40 mpm et on a adopté un dévidage mixte des cocons pour obtenir la soie grège de la meilleure qualité. En 1927, la machine de dévidage (4 bouts, avec siège.) a été convertie en machine de dévidage multibouts avec une posture debout. M/s Katakura Seishi a été le premier à convertir sa vieille machine de dévidage avec des machines de dévidage multibouts et il a introduit de nouvelles techniques de gestion, c'est à dire que jusqu'à cette date seule la productivité était importante mais la qualité l'a supplantée et cela a donné la soie grège Midorikawa et son prix a augmenté de 33 %. Cependant, la transformation des machines de dévidage en multibouts avec la qualité comme objectif a été très lente. En 1932, il n'y avait que 10 % qui avaient changé, en 1940, la conversion était de 36 % et on n'a obtenu un changement total qu'à partir de 1945 [Kinoshita (1997)].

En 1950, on a mis au point un dévidage mixte du cocon adapté pour la machine multi-bouts en rapport avec la courbe de distribution de la taille des cocons. Cela a un rapport avec la régularité du titre de la soie grège. Oki (1955) a mis au point l'indicateur du titre, qui permet de détecter le titre de la soie grège pendant le dévidage. De plus, avec la machine de dévidage multibouts, on a mis au point un indicateur de titre minimum, qui donne de meilleurs résultats que la technologie de dévidage fixe et mixte. En 1965, la machine de dévidage multibouts a été complètement convertie en machine de dévidage automatique au Japon avec un dispositif indiquant le titre et des convoyeurs [Kinoshita (1997)].

IMPORTANCE DU PROCESSUS DE CUISSON DU COCON

La cuisson du cocon est un processus par lequel on fait pénétrer l'eau chaude de l'extérieur de la coque soyeuse à l'intérieur de la coque soyeuse et vice-versa, de sorte que les couches de la coque et la sérécine aux points de croisement soient correctement amollis. Pendant le processus de cuisson du cocon, l'air à l'intérieur de la coque soyeuse chauffe, se dilate, et s'échappe par la coque soyeuse. La dilatation de l'air à l'intérieur de la coque soyeuse crée une différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la coque soyeuse, ce qui permet à l'eau de pénétrer dans les cocons. L'efficacité de la cuisson des cocons dépend donc du rouissage des cocons, de la température élevée pour l'imprégnation, de la température basse pour les processus d'imprégnation, de cuisson, d'ajustement et de finition [Kinoshita et coll. (1980)].

On observe d'après les études réalisées jusqu'à présent que le degré de gonflement et d'amollissement de la sérécine dépend du processus de pré-traitement pendant la cuisson des cocons. L'absorption de l'eau et de la teneur en eau de la coque et dans le cocon, la transmission de la chaleur et le moyen de chauffage ont une répercussion directe sur le processus de cuisson. Pour obtenir le gonflement de la coque soyeuse au niveau désiré, il faut contrôler les paramètres suivants de cuisson du cocon, c'est à dire les températures et les durées de rouissage, d'imprégnation, de cuisson et d'ajustement.

Même après 100 ans d'études et d'expériences, il n'a pas été possible d'arriver à standardiser les profils et les durées de température pour la cuisson du cocon. Les chercheurs japonais pensent que l'on peut choisir les durées et les profils de température le jour du dévidage en fonction de paramètres variés dominant dans les filatures [Kinoshita et coll., (1993a)]. Avant le début de la production de masse, la pratique dans les filatures japonaises était de tester un petit lot de cocons dans une machine de cuisson avec un ensemble de profils de température et l'adaptabilité des cocons au dévidage était évaluée par un groupe de personnes travaillant dans la filature. Puis, on choisissait et on fixait le profil de température de cuisson le plus adapté et on commençait la production continue. Si cela est l'approche pratique dans les filatures Japonaises organisées, traitant de grandes quantités de cocons de qualité élevée, il apparaît que dans les conditions indiennes, une telle approche pratique est encore plus justifiée. Il est donc nécessaire de comprendre le comportement des cocons poly-bivoltins indiens pendant le processus de cuisson particulièrement les cocons séchés à l'air chaud.

La technologie de cuisson adoptée dans les filatures modernes comprend les opérations de rouissage, d'imprégnation, de cuisson, d'ajustement et de finition. Ces processus doivent être réalisés dans le même ordre pour obtenir une cuisson efficace des cocons. La température et la durée varient en fonction de la qualité du cocon.

TRAITEMENT DE ROUISSAGE

Le rouissage est le premier processus de cuisson des cocons. L'objectif du rouissage des cocons est de permettre à la coque sèche des cocons d'absorber les molécules d'eau pour faciliter la cuisson. Quand on rouit les cocons dans l'eau chaude, des capillaires se développent en fonction de la structure de la coque et l'eau pénètre à l'intérieur de la coque soyeuse. Une fois que la coque est humidifiée, une plus grande quantité d'eau peut être absorbée par la suite. Shimazaki et Sekijima (1961b), Shimazaki et Yamamoto (1962a) et Shimazaki et coll., (1966) ont étudié la relation entre le processus de rouissage et la pénétration de l'eau dans le cocon. Pour éviter la sur-cuisson de la coque soyeuse, on a étudié la teneur en humidité de la coque soyeuse, la pénétration de l'eau dans la coque soyeuse et la technologie de cuisson des cocons et on l'a conseillé aux filatures. De plus, Koike et Murayama (1953, 1954) et Koike (1963a, 1963b et 1963c) ont émis l'hypothèse que la teneur en humidité de la coque soyeuse est liée à la température de cuisson. On a aussi étudié le pré-traitement du cocon et son effet sur la teneur en humidité dans la coque soyeuse et on a souligné son importance. Moriee (1942 et 1959) a mis au point une technologie de cuisson en utilisant un traitement de température

plus faible pour le rouissage, de sorte qu'après l'humidification, l'air peut s'échapper et sèche presque les cocons après le rouissage. Hariraj et Kinoshita (1994) ont rapporté l'influence de la température de rouissage sur l'imprégnation de l'eau dans le cocon et la teneur en humidité dans la coque soyeuse à la fois chez les cocons hybrides bivoltins indiens et japonais et en ont déduit que l'absorption de l'eau augmente avec l'augmentation de la température de rouissage.

Les cocons séchés à l'air chaud, qui sont séchés au niveau optimum développent un caractère d'imperméabilité à l'eau et posent des difficultés pour la cuisson du cocon. Donc, en traitant ces cocons à une température unique comme c'est la pratique dans le secteur de l'industrie de dévidage de la soie indienne cela diminue la productivité et altère la qualité de la soie grège. La sélection d'une température adaptée pour le rouissage des cocons poly-bivoltins indiens faciliterait la cuisson des cocons.

TRAITEMENT D'IMPREGNATION

Pour obtenir la pénétration de l'eau dans les couches internes des cocons, on traite les cocons à température élevée quand l'air chauffe à l'intérieur et se dilate. L'air chaud et dilaté est ensuite expulsé de l'intérieur des cocons, ce qui crée une différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur du cocon. Cette différence de pression entraîne la pénétration d'une certaine quantité de vapeur et d'air chaud dans le cocon par les couches du cocon. Le traitement d'imprégnation à température élevée est immédiatement suivi par un traitement à faible température quand les cocons traités à température élevée sont immergés dans un bain d'eau à faible température. Quand cela a eu lieu, la vapeur qui a pénétré à l'intérieur du cocon pendant le traitement à température élevée se condense en eau puis une différence de pression plus élevée se crée dans le cocon, ce qui permet à une plus grande quantité d'eau de pénétrer dans les cocons. Pendant le traitement d'imprégnation la séricine de la couche interne de la coque soyeuse gonfle et s'amollit de manière uniforme, ce qui entraîne une meilleure efficacité de dévidage et une augmentation de la productivité. Yamamoto (1917) a utilisé une température élevée d'imprégnation de 95° C pendant 25 secondes, suivie immédiatement par une d'imprégnation basse de 65° C pendant 5 secondes dans l'eau chaude pour comprendre le pre-traitement du cocon. De plus, Yamamoto a mis un point au processus par lequel les cocons pre-traités sont traités avec une eau à faible ébullition pour permettre la pénétration de l'eau dans les cocons, de sorte que les cocons qui sont en position horizontale se tournent en position verticale avec la tête au-dessus du niveau de l'eau. Dans ces conditions, il a rapporté qu'on parvient à une cuisson appropriée / adaptée pour le dévidage.

Chiba (1927) a mis au point une technologie par laquelle on évite la sur-cuisson de la coque soyeuse et on obtient l'humidification correcte de la coque soyeuse par l'imprégnation à la vapeur. Katsuno (1969, 1973, 1974) et Katsuno et coll., (1978) ont étudié l'effet du pre-traitement du cocon sur l'absorption de l'eau, la teneur en humidité de la coque soyeuse, le pre-traitement des cocons pendant le processus de cuisson et son effet sur la performance de dévidage et en ont déduit que le pre-traitement de cuisson du cocon influence considérablement la performance de dévidage. Hiashi (1935) a rapporté une méthode pour la cuisson correcte de la coque soyeuse. On fixe la température de dévidage et la vitesse de dévidage pour obtenir une tension de dévidage de 0,3 g / d en utilisant la cuisson des cocons, de façon à améliorer le pourcentage de soie grège et la qualité de la soie grège. Ce système se réfère à la "théorie du processus de tension de dévidage" et on l'associe à l'obtention d'une tension uniforme en utilisant une technologie de cuisson.

Ainsi, l'imprégnation dans le processus de cuisson facilite l'amollissement adapté de la séricine des couches externe et interne. Dans les unités de dévidage indiennes, on procède à l'opération d'imprégnation indirectement, c'est à dire par l'étouffement des cocons à la vapeur qui retient l'humidité dans la coque soyeuse en facilitant l'humidification de la coque avant la cuisson, suivi par un traitement à température d'ébullition dans une bassine unique, qui est le traitement à température d'imprégnation élevée. Cela est suivi par le transfert immédiat des cocons dans la bassine de dévidage

(après le purgeage dans la bassine de dévidage), ce qui facilite le traitement à faible température d'imprégnation. Bien que l'ordre des opérations corresponde au traitement d'imprégnation, il se produit un grand laps de temps entre les processus et la comparaison n'est là que pour faciliter la compréhension correcte [Hariraj (2002)].

TRAITEMENT DE CUISSON

On soumet les cocons au traitement de cuisson après les processus de pre-traitement c'est à dire le rouissage, l'imprégnation à température élevée et l'imprégnation à faible température. Le traitement de cuisson est d'une importance extrême puisqu'il décide de la quantité d'eau absorbée dans le cocon (système semi - immergé / système immergé de dévidage) du niveau de production de déchets, du niveau de gonflement de la séricine, de la qualité de la soie grège dévidée etc. Le traitement de cuisson est suivi par le traitement d'ajustement et de finition. Pendant le traitement d'ajustement, on ajoute de l'eau froide au bain de cuisson de sorte que la température du bain diminue progressivement pour faciliter la pénétration maximum de l'eau dans les cocons. De plus, le schéma de diminution de la température devrait être tel que le durcissement de la séricine dans toute la coque soyeuse devrait être uniforme. Après le traitement d'ajustement, on stocke les cocons cuits (finis) à une température d'environ 30-40° C avant de les prendre pour l'opération de purgeage [Kinoshita et coll. (1980 et 1982b)].

Avec les machines de dévidage automatiques, les cocons cuits sont purgés automatiquement et transférés dans la bassine de dévidage. Les déchets générés avec une machine de dévidage automatique tendent à être assez élevés par comparaison à la technologie de dévidage multibouts. Plusieurs chercheurs ont rapporté des techniques de cuisson adaptées pour le dévidage automatique dans le but de produire de la soie de qualité élevée, une meilleure récupération de soie grège avec une diminution de la génération des déchets de soie. On a mis au point une technologie de cuisson dans le but d'améliorer la qualité de la soie grège en diminuant en même temps la génération de déchets de soie. Nakagawa (1932) a mis au point une technologie de cuisson comprenant le pre-traitement, la cuisson à 98° C pendant environ 2 minutes avec une ébullition douce, suivies par l'ajustement et la finition. Cette méthode améliore le pourcentage de soie grège et diminue les défauts de propreté de la soie grège.

Koike (1964a, 1964b, 1965, 1966a, 1966b, 1967) et Koike et coll., (1969, 1970) ont conseillé le pre-traitement des cocons et ils pensent qu'il influence l'absorption de l'eau dans le cocon et la teneur en humidité dans la coque. Ce pre-traitement de cuisson influence les paramètres de cuisson, de dévidage et la qualité de la soie grège. De plus, il a étudié l'effet de la pression de l'air sur l'imprégnation de l'eau dans la coque soyeuse et sur le moyen de transmission de la chaleur et a mis au point une technologie de cuisson du cocon. Shimazaki et Yoshizawa (1952, 1953a, 1953b), Shimazaki et coll., (1962b, 1962c) et Shimazaki (1973, 1977, 1983) ont réalisé une série d'études systématiques pour comprendre le processus de cuisson du cocon. Dans ces études, il s'est penché sur l'amélioration de la récupération de soie grège et a mis en avant le concept de machine de cuisson des cocons à convoyeur de type V avec lequel on peut contrôler les températures de rouissage, d'imprégnation, de cuisson à la vapeur et d'ajustement de sorte qu'on peut fixer les paramètres pour les cocons de différentes qualités. Okamura et coll., (1954 et 1955) ont rapporté une technique de cuisson employant la chaleur infrarouge dans la partie cuisson du convoyeur. De plus, Koewae (1959 et 1960) a repositionné le système d'émission de rayons infrarouge et fait passer l'air par le système d'émission d'infrarouges dans la partie cuisson à la vapeur, de sorte qu'on peut arriver à une température élevée pour la cuisson des cocons. Moriee (1942 et 1959) a étudié une technique de cuisson en utilisant le traitement à faible température dans la zone de rouissage. De plus, il a étudié le niveau d'eau entrant dans les cocons pendant le processus de rouissage et d'imprégnation ainsi que son influence sur le processus de cuisson et sur le processus d'ajustement.

Ono (1973, 1976a, 1976b) a étudié la cinétique de la cuisson par rapport à la pénétration d'eau dans la coque soyeuse et la durée de cuisson. Dans cette méthode de cuisson, alors que la durée diminue et le pourcentage de soie grège et la couleur de la soie s'améliorent, la qualité de la soie baisse avec plus de problèmes de fil. Katsuno (1983, 1985) a étudié la température et la durée de cuisson par rapport à la teneur en eau de la coque soyeuse et la teneur en humidité et mis au point une technologie de cuisson adaptée pour les cocons de qualité inférieure avec une mauvaise dévidabilité.

Il a été rapporté par Shimazaki (1986), Koike (1972) que la sérécine de la coque se dissout considérablement dans l'eau chaude après 90° C et ils ont observé qu'autour de 100° C, une augmentation de la température d'un degré entraîne la dissolution maximum de la sérécine et le trop grand ramollissement de la couche de sérécine. Si l'eau est soit chaude ou en ébullition, il y aura beaucoup de transfert de chaleur vers les coques soyeuses, ce qui conduira au trop grand ramollissement de la coque soyeuse. De plus, si l'on procède au traitement de pression, on peut atteindre des températures plus élevées et on peut éviter le trop grand ramollissement de la couche soyeuse. Si les cocons sont traités à environ 100° C pendant de longues périodes, il se produit un trop grand ramollissement de la coque. Donc, quand les cocons rentrent dans la partie d'ajustement, il faut baisser la durée de traitement. Ainsi, dans la partie d'ajustement une baisse soudaine de la température est conseillée pour éviter le trop grand ramollissement des couches externes des coques soyeuses. Ainsi, on décide des bases de la technologie de cuisson des cocons d'après l'absorption de l'eau dans la coque soyeuse et d'après le moyen de transmission de la chaleur.

On n'aboutit pas à la cuisson de la couche interne pendant le traitement d'imprégnation, mais on y aboutit pendant les traitements de cuisson et d'ajustement. La littérature disponible confirme donc clairement que le processus complet de cuisson consiste dans le rouissage, l'imprégnation, la cuisson, l'ajustement et le choix d'une température et d'une durée adaptée pour améliorer la productivité et la qualité de la soie grège.

PERFORMANCE DE DEVIDAGE

Au cours du dévidage de la soie, les facteurs de qualité du cocon liés à la cuisson, l'obtention de la technologie de la cuisson la plus adaptée d'après la qualité du cocon ainsi que le processus de contrôle, sont des nécessités de base pour un fonctionnement efficace. Le processus de contrôle est difficile quand les qualités des cocons sont différentes et de petits lots sont mélangés. Pour surmonter ces problèmes, on a accumulé la technologie / l'expertise disponible sur le plan informatique sous forme de base de données et en utilisant ces informations, on a mis au point un système expert au Japon [Kinoshita et Tajima (1990)], Kinoshita et coll., (1993a, 1993b) et permettre aux filatures de les utiliser pour améliorer l'efficacité de cuisson des cocons.

Pour arriver aux conditions de cuisson optimum, le pourcentage de soie grège est un facteur important [Shimazaki (1986)]. Le trop grand ramollissement de la coque soyeuse entraîne plus de dissolution de la sérécine et de génération de déchets pendant les opérations de dévidage et la production de soie grège diminue. Ainsi, toutes les couches de la coque soyeuse doivent être amollies de manière uniforme. De plus, la sous-cuisson et la sur-cuisson augmentent le pourcentage de déchets. La génération de déchets pendant le premier purgeage des cocons cuits a une relation directe avec le pourcentage de soie grège. Si la génération de déchets augmente de 1 pour-cent, alors la production de soie grège baisse de 3 pour-cent [Shimazaki (1961a)]. De plus, les problèmes de fil, la génération de déchets et l'épaisseur de la couche de pélette influencent le pourcentage de soie grège. La seule diminution du pourcentage de déchets n'améliore donc pas la récupération de soie grège parce qu'il y aurait une dissolution de sérécine pendant la cuisson.

La température dans la partie cuisson du convoyeur influence le gonflement des cocons, la rupture de la couche externe des cocons et le gonflement de la coque. Cependant, il n'y a pas de relation significative avec les cocons dont la couche interne est cassée. Il faut donc augmenter la température de la bassine de dévidage pour diminuer le nombre des cocons dont la couche interne est cassée.

Shimazaki (1986) a rapporté l'importance de la température et de la durée dans la zone de cuisson et du temps pour augmenter la qualité de production. De plus, il a mis l'accent sur le choix de la température de cuisson qui décide de manière critique de la dissolution de la sérécine et des caractéristiques de qualité de la soie grège.

Il faut donc à la fois adopter un séchage, une cuisson adaptés et un processus de dévidage approprié pour améliorer la performance de dévidage et la qualité de la soie grège produite.

CARACTERISTIQUES DE L'EAU

L'eau joue un rôle vital, pour obtenir le gonflement des cocons avec des coques dures. En diminuant le pH et l'alcalinité dans l'eau de cuisson, on peut obtenir le ramollissement et le gonflement de la coque soyeuse dure. L'eau traitée en utilisant le cycle H influence la cuisson des cocons et diminue donc la dévidabilité et le pourcentage de soie grège et augmente la couche de pélette et le pourcentage de déchets. Shimazaki (1986) a rapporté que si on diminue l'alcalinité en-dessous de 10 ppm, cela augmente les déchets de la couche de pélette. De plus, Ogiha (1956) a établi une corrélation entre le cycle H de l'eau, le pH et la solubilité de la sérécine. Il a indiqué que, si le pH est autour de 4,2, la solubilité de la sérécine est minimum. Il a aussi indiqué que dans l'eau naturelle, il n'y a pas de relation entre le pH et la solubilité de la sérécine, cependant il existe une corrélation élevée entre la conductivité et la solubilité de la sérécine.

L'eau chaude au-dessus de 90° C dissout radicalement la sérécine de la coque et autour de 100° C, il se produit une dissolution maximum de la sérécine, ce qui entraîne un trop grand ramollissement de la sérécine dans les couches du cocon. Comme l'eau chaude a plus de bulles pendant le traitement de cuisson cela augmente le transfert de chaleur aux coques soyeuses, ce qui entraîne un trop grand ramollissement de la coque soyeuse. Cependant, si l'on procède à un traitement de pression, cela entraîne la diminution des bulles dans l'eau chaude (puisque l'on peut atteindre une température élevée grâce à la pression), et il n'y aura pas de trop grand ramollissement de la coque soyeuse [Shimazaki (1986), Koike (1972)].

Quand on traite les cocons à 100° C pendant une longue période au cours du traitement de cuisson, cela provoque un trop gros ramollissement de la coque. Ainsi, pendant l'ajustement, une baisse soudaine de la température est conseillée pour éviter le trop grand ramollissement des couches externes des coques soyeuses. Les bases de la technologie de cuisson des cocons sont donc décidées par l'absorption de l'eau dans la coque soyeuse et le moyen de transmission de la chaleur et les qualités de l'eau comme, le pH, l'alcalinité-M, la dureté qui ont aussi des répercussions sur la technologie de cuisson [Kinoshita (1997)].

Yamada (1962, 1963a) et Miyauchi (1979) ont rapporté que l'alcalinité-M a une influence sur la dévidabilité des cocons et la dureté est liée au poids de la pélette et au pourcentage de perte de la sérécine. Bito (1973) a étudié les caractéristiques de l'eau disponible dans des filatures variées au Japon et caractérisé la chimie de la sérécine. D'après ses études, on a constaté que l'alcalinité M est en relation maximum avec la solubilité de la sérécine. Yamada (1963b, 1967) a étudié la qualité de l'eau qui dissout facilement la sérécine (qui retient étroitement les couches du cocon). Il a aussi étudié l'influence du cycle H du traitement de l'eau sur la cuisson des cocons. D'après les études ci-dessus, on constate qu'avec le processus de dévidage automatique, l'eau pour l'imprégnation et la chaleur infra-rouge utilisées dans la méthodologie de cuisson diminuent la solubilité de la sérécine, améliorent le pourcentage de soie grège et augmentent les bouts volants et les défauts de propreté, ce qui diminue donc la qualité de la soie grège. On a obtenu un équilibre entre les défauts de propreté et le pourcentage de soie grège en utilisant la technologie de cuisson appropriée.

CONCLUSION

D'après ces études, on peut donc conclure que la qualité du cocon joue un rôle important pour la production de soie de qualité en association avec les paramètres du processus de cuisson. La cuisson des cocons est au cœur de l'opération du dévidage et si l'on ne s'en occupe avec soin, cela entraîne des résultats désastreux. Il faut sélectionner avec soin les paramètres de cuisson pour chaque lot de cocons quotidiennement pour obtenir les résultats désirés. La vente de soie grège basée sur la qualité faciliterait l'adoption d'une technologie de cuisson correcte dans les filatures de soie.

ULTRASTRUCTURE OF INGRESS, INFECTION AND SPORULATION OF VARIOUS PATHOGENS CAUSING FOLIAR DISEASES IN MULBERRY - AN APPRAISAL

V.P. GUPTA*, VINEET KUMAR, R.K. RAJAN & S.B. DANDIN

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

Diseases have always been the major limiting factor for the production of quality leaves in mulberry (*Morus* spp.). Being a crop of perennial nature and wide climatic adaptability, mulberry is afflicted by a variety of pathogens throughout the year. These pathogens perpetuate rapidly during favourable climatic conditions and cause extensive damage to mulberry crop by impeding plant growth and deteriorating leaf quality. Feeding silkworm with diseased leaves adversely affects the growth and development of silkworm larvae and ultimately deteriorates the commercial characters of cocoons and quality of raw silk (Noamani *et al.*, 1970; Siddaramaiah and Hegde, 1990; Gupta, 2001; Vidyasagar and Kotresha, 2003).

Although the intensity of diseases varies with season, mulberry variety and cultivation practices, the interactions between mulberry plant and pathogens play major role in causing infection and degree of damage. Successful infection of a host plant by a pathogen involves various events like landing, movement and attachment of the pathogen on plant surface, recognition of site(s) on plant surface for ingress by the pathogen, invasion of plant by the pathogen and proliferation / sporulation of pathogen on host plant. Furthermore, the pathogens of airborne nature, which have direct accessibility to plant shoot, possess various complex mechanisms to overcome the adversities on the plant surface in causing infection. In mulberry, since a number of airborne pathogens are known to cause serious foliar diseases, it is most essential to understand their complex infection process for the development of proper disease management strategy. In the present paper, various foliar diseases of mulberry are described for the infection events of their causal pathogens at ultrastructural level.

Keywords: Mulberry, foliar diseases, host-pathogen interactions, ultrastructural observations.

1. MULBERRY RUST

Rust disease is prevalent in almost all the mulberry growing parts of the world. Generally, two types of rust symptoms appear in mulberry. Under sub-tropical climate of south India, leaf rust caused by a fungal pathogen, *Cerotelium fici* is most common, whereas red rust caused by another fungal pathogen, *Aecidium mori* is prevalent in temperate climate of India and other parts of the world.

1.1. Leaf Rust:

* Corresponding author : Dr. V.P. Gupta Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore – 570 008, India. Phone: +91-821-2362992, 2362406; Cell: +91-9448165466. Fax: +91-821-2362420 / 2362845. E-mail: guptavp1010@yahoo.com, guptavpcsrtri@rediffmail.com

Leaf rust disease occurs in southern peninsular India during post-rainy and winter seasons. The temperature ranging between 22 and 26° C with high relative humidity of above 70% is most congenial for rust occurrence. The disease manifests as numerous pin-head sized small brownish spots on the adaxial (upper) surface of mulberry leaves concomitant with brownish to black eruptive pustules on the abaxial (lower) surface, leading to yellowing, drying and premature defoliation. Leaf rust affects mulberry plants at later stage of its growth (usually 50 days after pruning), as mature leaves are more prone to disease than the tender ones, resulting in shortage of mulberry foliage during late age rearing of silkworm (Gupta, 2001).

Cerotelium fici Cast. (Arth.) (Class: Basidiomycetes; Order: Uredinales; Family: Uredinaceae) is the causal pathogen of leaf rust (Sydow *et al.*, 1907). However, its identity has also been reported as *Peridiospora mori* Barclay (Prasad *et al.*, 1993). It is an obligate microcyclic fungus which survives on mulberry as mycelium, uredinia (or uredia) and urediniospores (or uredospores). Uredinia (fruiting bodies) usually appear as oval or elongate brownish spots which occur primarily on abaxial surface of mulberry leaf but later concomitant with other uredinia on adaxial surface. Ultrastructural study reveals that the mature uredinia with cellular peridium enclose numerous sub-sessile highly thick walled urediniospores. The ramifying mycelium and subsequent production of broadly clavated sterile structures, known as paraphyses, and abundant urediniospores help in rupturing the epidermis and release the urediniospores (Fig. 1). The urediniospores are echinulate (spiny), globoid or broadly ellipsoidal, measuring 15-18 µm × 12-15 µm (L × W). The ornamental surface of urediniospore bears conical spines, each occurred in a small circular depression with slightly raised annulus. These spines are evenly distributed over entire spore surface, except hilum (detachment scar of pedicel). Each urediniospore has 3-4 scattered depressed germ pores on its surface (Fig. 2). The germ tubes emerge from these germ pores and extend on mulberry leaf surface before terminating into characteristic penetration structures, called appressoria. Unlike most of the rust fungi, *Cerotelium fici* penetrates mulberry leaves directly by piercing the epidermal layer, but not through stomata. Its germ tubes, though cross over the stomata (Fig. 3), neither form appressoria over the stomata nor enter through stomatal openings. The hyaline and swollen appressorium develops a furrow from its lower surface, which gives rise to penetration pegs or primary infection hyphae (Fig. 4). These hyphae pierce the leaf cuticle and epidermis and thus enter the leaf tissues and cause infection (Gupta *et al.*, 1994).

Urediniospores remain viable for several months under favourable conditions and disperse through water droplets and wind current. Long distance dissemination of the pathogen takes place through air-borne urediniospores.

1.2. Red Rust:

Red rust is more prevalent in China, Japan, Korea and other sub-tropical countries cultivating mulberry. However, in India, it is observed occasionally in northern and north-eastern regions. Red rust affects young buds, leaves, petioles and shoots. Upon infection, the buds swell and curl up in abnormal shape, giving rise to several slightly protruded yellow spots. The symptoms on leaves appear as numerous small, round and shiny-yellow coloured protruded spots on both the surfaces, and on stem and petioles as reddish-brown lesions (Wang, 1980; Teotia and Sen, 1994).

Aecidium mori (Sydow & Butler) Barclay (Class: Basidiomycetes; Order: Uredinales; Family: Uredinaceae) causes red rust in mulberry (Sydow *et al.*, 1907). It is a typical microcyclic rust fungus which reproduces sexually and exists on mulberry mainly as mycelium, aecia and aeciospores. The aecia of *A. mori* are cupulate and orange-yellow in colour, enclosing numerous aeciospores. The thick-walled aeciospores are mostly binucleate having echinulated surface. The aeciospores liberate from cupulate aecia and disperse mainly through wind current. Upon germination, the aeciospores produce relatively shorter germ tubes which penetrate mulberry leaves either by directly piercing the leaf cuticle or through stomatal openings. As infection progresses, the septate mycelium of *A. mori* grows both inter- and intra-cellularly within the host tissues and sends haustoria into the cells to absorb

nutrients. *A. mori* moves through vascular bundles to cause symptoms on shoots and petioles (Wang, 1980).

A temperature around 24 °C is most congenial for the occurrence of red rust disease in mulberry. *Aecidium mori* overcomes the unfavourable conditions as mycelium or aeciospores in aecia on old plant parts or in dead plant debris. Overwintering aeciospores act as primary source of infection under favourable weather conditions (Wang, 1980; Teotia and Sen, 1994).

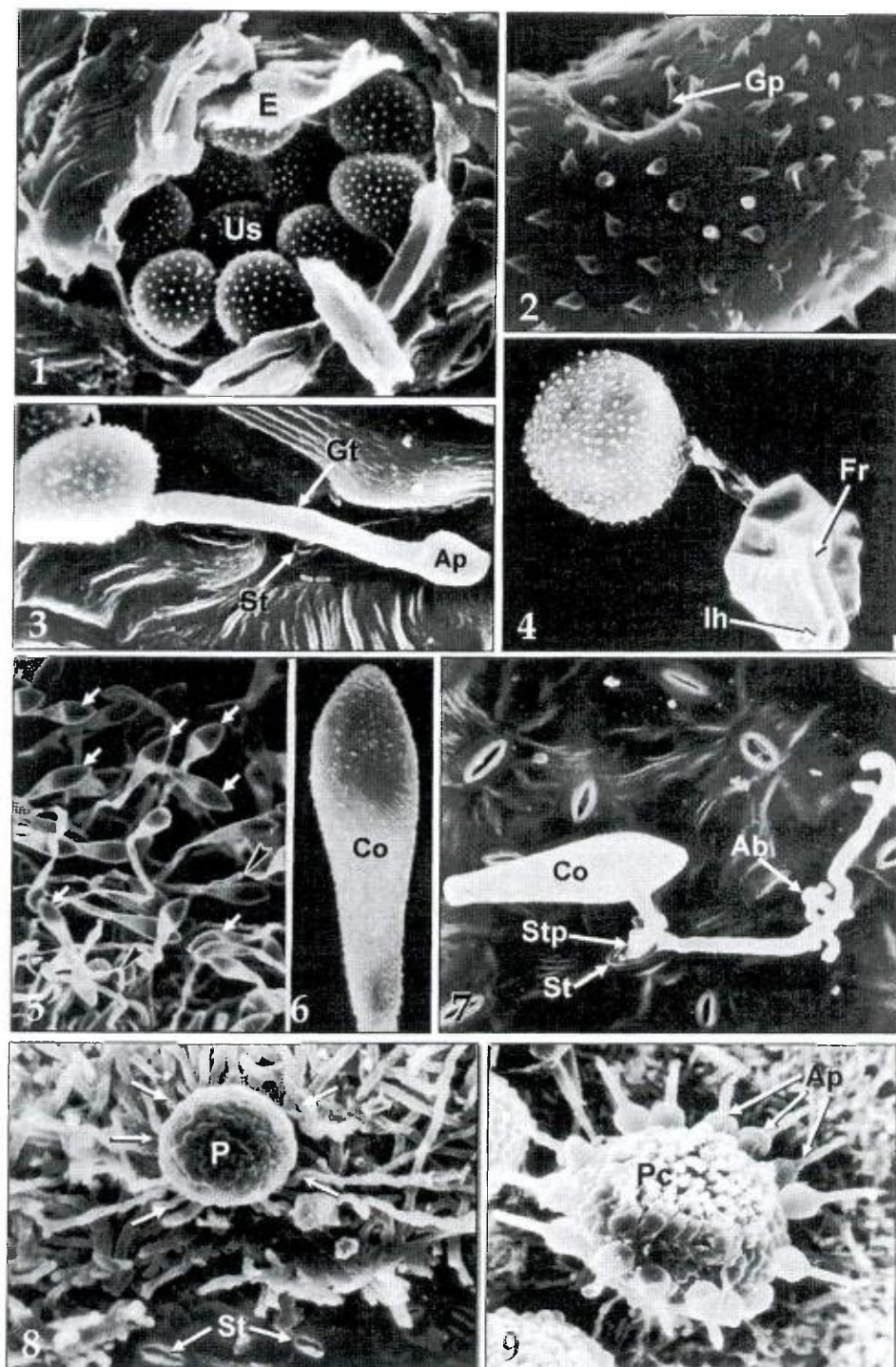
2. POWDERY MILDEW

Powdery mildew is widespread in all the mulberry growing countries. However, its incidence and intensity vary with geographic regions and seasons. It is more severe during post-rainy to winter season in tropics and spring to autumn in temperate regions. The disease is characterized by the appearance of white or ash-coloured powdery patches on the abaxial surface of mulberry leaves. On advancement of infection, the powdery patches spread over entire abaxial surface and turn blackish in colour whereas the corresponding portion on the adaxial leaf surface develops chlorotic lesions (Gupta, 2001).

An obligate parasite, *Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst. (Class: Ascomycetes; Order: Erysiphales; Family: Erysiphaceae) is a causative agent of powdery mildew in mulberry (Salmon, 1905). From Japan, it has also been identified as *Phyllactinia moricola* (P. Henn.) Homma. The development and distribution of *Phyllactinia corylea* (= *Phyllactinia moricola*) are greatly influenced by environmental factors which have great impact on its spore germination, growth, reproduction, sporulation and dissemination. Depending upon environmental conditions, *P. corylea* may reproduce by both asexual and sexual methods. It reproduces asexually by means of conidia under tropical and sub-tropical conditions; whereas it overwinters by developing the perithecia and reproduces sexually by means of ascospores under temperate climatic conditions (Kunoh *et al.*, 1980; Takamatsu *et al.*, 1982; Kumar *et al.*, 1998; Kumar and Gupta, 2004).

Phyllactinia corylea behaves semi-exoparasitically on mulberry leaves, as it grows externally on the abaxial leaf surface and enters the leaf tissues through open stomata. *P. corylea* produces hyaline mycelium which gives rise to perpendicular, straight or spirally coiled conidiophores, each bearing single conidium at their tips (Fig. 5). Mature conidia are hyaline, unicellular and clavate, measuring 40 µm x 12 µm (av. L x W). Scanning electron microscopic studies reveal that the conidial surface is ornamented with evenly distributed spine-like protrusions which may help conidia in its adherence to the abaxial surface of mulberry leaf (Fig. 6). Conidia are mainly dispersed through wind current. The hyaline conidia, upon germination on abaxial leaf surface, produce germ tubes which after extending over the leaf surface terminate into lobed adhesion bodies. Adhesion bodies give rise to infection hyphae which grow extensively on the leaf surface and produce several short, lateral branches with or without adhesion bodies at their apices. The surface topographic study reveals that the lateral branches that are formed near the stomata, known as stomatopodia, invade the leaf through stomatal openings and do not form the adhesion bodies, while those are remote from the stomata terminate into adhesion bodies and help fungal mycelium to stick on the leaf surface (Fig. 7). The stomatopodia continue to grow as internal hyphae into the intercellular spaces of leaf tissues. The intercellular hyphae give rise to haustoria to absorb nutrients from the leaf tissues (Kunoh *et al.*, 1980; Kumar *et al.*, 1998).

Phyllactinia corylea starts reproducing sexually by developing perithecia, when the conidial production slows down to cease due to the changes in climatic conditions at the end of summer in temperate regions. White young perithecia start appearing on white mycelium of *P. corylea* on mulberry leaves, which later turn orange to reddish-brown and finally black when matured.



Scanning electron microphotographs of :
Microphotographies électroniques par balayage :

Fig. 1. A mature uredinium of *Cerotelium fici* on mulberry leaf surface containing numerous urediniospores (Us) which are coming out by rupturing the epidermis (E).

Fig. 1. Uredinium mature de *Cerotelium fici* sur la surface de la feuille de mûrier contenant de nombreuses urédiniospores (Us) qui sortent en rompant l'épiderme (E).

Fig. 2. Mature urediniospore of *Cerotelium fici* with echinulated surface and depressed germ pore (Gp).

Fig. 2. Urédiniospore mature de *Cerotelium fici* avec une surface échinulée et un pore germinatif déprimé (Gp).

Fig. 3. A germ tube (Gt) of *Cerotelium fici* crossed over a stomata (St) and formed the appressorium (Ap) close to but not over the stomata.

Fig. 3. Tube germinatif (Gt) de *Cerotelium fici* passant sur un stomate (St) et formant l'appressorium (Ap) à côté mais pas au-dessus du stomate.

Fig. 4. Lower surface of an appressorium of *Cerotelium fici* showing primary infection hyphae (Ih) emerging from appressorial furrow (Fr).

Fig. 4. Surface inférieure d'un appressorium de *Cerotelium fici* présentant des hyphes (Ih) avec une infestation primaire émergeant d'un sillon appressorial (Fr).

Fig. 5. Abundant conidia (arrows) of *Phyllactinia corylea* developed singly at the tips of spiral conidiophores (arrow heads).

Fig. 5. Conidies abondantes (flèches) de *Phyllactinia corylea* s'étant développées séparément aux extrémités des conidiophores en spirale (têtes de la flèche).

Fig. 6. A conidium (Co) of *Phyllactinia corylea* with spine-like protrusions on its surface.

Fig. 6. Une conidie (Co) de *Phyllactinia corylea* avec des protrusions comme des épines sur sa surface.

Fig. 7. A germinating conidium (Co) of *Phyllactinia corylea* on mulberry leaf surface giving rise to stomatopodia (Stp) and adhesion bodies (Ab). Note a stomatopodium invading the leaf through stomatal opening (St).

Fig. 7. Une conidie de *Phyllactinia corylea* en germination (Co) sur la surface de la feuille de mûrier donnant naissance à des stomatopodies (Stp) et à des corps d'adhésion (Ab). Notez la présence d'un stomatopodium envahissant la feuille par une ouverture stomatale (St).

Fig. 8. An immature globose perithecium (P) of *Phyllactinia corylea* giving rise to a large number of hyphae from near its base (arrows), which radiated on mulberry leaf surface. A part of infected leaf with stomata (St) adjacent to perithecium can also be seen.

Fig. 8. Perithecium globulaire immature (P) de *Phyllactinia corylea* donnant naissance à un grand nombre d'hyphes près de sa base (flèches), qui irradient sur la surface de la feuille de mûrier. On peut aussi voir une partie de la feuille infestée avec des stomates (St) près du perithecium.

Fig. 9. An overview of a perithecium of *Phyllactinia corylea* crowned with penicillate cells (Pc) and acicular appendages (Ap) with ballooned bases.

Fig. 9. Vue d'ensemble d'un perithecium de *Phyllactinia corylea* entouré par des cellules pénicillées (Pc) et des appendices aciculaires (Ap) avec des bases enflées.

Ultrastructural studies reveal that the perithecial development begins with the coiling of two short specialized structures, antheridium (male) and ascogonium (female) which emerge from two separate hyphae. On coiling around one another, these structures fuse together to develop into an egg-shaped perithecial primodium. On subsequent development of wall layers, the perithecial primordia develop into ball-like shapes covered with protruded wall cells with clear margins. At this point of perithecial development, numerous hyphae arise from the swollen wall cells on the lower side (near the base) of

immature ball-shaped perithecia, which radiate on leaf surface and thus help the perithecia to fix to the surface (Fig. 8). On further maturation, the upper wall cells of perithecia start swelling while the wall cells at perithecial equatorial planes shrink. The swollen cells later elongate and finally develop into characteristic penicillate cells with cylindrical bases and about 10 sterigma-like projections at their apices. When perithecia crowned with immature penicillate cells, some of the previously shrunken wall cells at perithecial equatorial planes give rise to acicular appendages with ballooned bases (Fig. 9). Upon drying of mature perithecia, the acicular appendages bend down and push perithecia above the substrate and thus help them to liberate out. The apical sterigma-like projections of penicillate cells of mature perithecia secrete a paste-like granular substance from their apical openings, which enables dispersed perithecia to attach to mulberry leaves and branches. The asci are liberated by splitting of dried perithecia, which later liberate ascospores during favourable conditions (Takamatsu *et al.*, 1982; Kumar *et al.*, 1998, 2001a; Kumar and Gupta, 2004).

3. LEAF BLIGHT

Leaf blight in mulberry is caused by both bacteria and fungi. Its occurrence has been reported from almost all the mulberry growing countries. It causes severe damage to mulberry foliage by destroying the leaf lamina. However, depending upon the behaviour of pathogen and environmental conditions, different types of blight symptoms appear on mulberry.

3.1. Bacterial Leaf Blight:

Bacterial leaf blight of mulberry occurs worldwide. In India, its occurrence has been reported from all the states wherever mulberry is grown. Persistent high relative humidity (~80%) and fluctuating temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) during rainy season favour the disease development. Soil is the primary source of disease spread and secondary infection takes place through irrigation and cultivation activities (Sato and Takahashi, 1973; Maji and Qadri, 1999).

Disease starts appearing as small water-soaked, irregular brown spots on the leaf lamina which later coalesce forming larger, irregular dark blackish-brown necrotic areas, giving blight appearance. On lower leaf surface, a typical shinning is associated with the symptoms due to the bacterial oozing. On advancement of disease, the veins and veinlets also become necrotic resulting in curling and rotting of leaves. Due to infection, the younger leaves get crinkled, distorted, curved outward and defoliate prematurely. On stem, the infection appears as dark irregular sunken lesions from which bacterial ooze is released (Gupta, 2001).

The causal bacterium is *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (Boyer and Lambert) Young *et al.* (Class: Schizomycetes; Order: Pseudomonadales; Family: Pseudomonadaceae). It is a gram negative, rod-shaped and motile bacterium, measuring $1.8\text{--}4.5\ \mu\text{m} \times 0.9\text{--}1.4\ \mu\text{m}$ (L $\times$ W). It usually overwinters within the diseased tissues, either on plant or plant debris in soil. Because of its high thermal death point (52°C), it can survive even in dry soil for a longer period of 3-4 months (Sato and Takahashi, 1973; Kubomura and Nakayama, 1975; Teotia and Sen, 1994; Maji and Qadri, 1999).

Pseudomonas syringae pv. *mori* prefers the grooves of veins and base of epidermal appendages on mulberry leaves for its multiplication (Fig. 10). The accumulated bacterial cells are dispersed by rain splash, wind and insects. Since bacteria do not produce germ tubes and appressoria, they cannot penetrate the cuticularized layer of plant tissues. *Pseudomonas syringae* pv. *mori* invades mulberry leaves through natural openings such as stomata (Fig. 11), hydathodes and cystoliths and also through wounds caused by wind, rain and insect attack (Teotia and Sen, 1994; Gupta *et al.*, 1995a).

3.2. Fungal Leaf Blight:

The species of *Fusarium*, *Alternaria* and *Helminthosporium* have also been reported to cause leaf blight in mulberry. Among these fungal pathogens, *Fusarium* spp. are worldwide in occurrence on

mulberry, whereas the prevalence of *Alternaria* and *Helminthosporium* spp. are usually confined to India, especially in southern peninsular region of the country. Although these fungal pathogens cause leaf blight disease in mulberry, they differ in initiation of symptoms, season of occurrence and disease severity.

3.2.1. *Fusarium* Leaf Blight:

Various species of *Fusarium* i.e., *F. pallidoroseum* (Cooke) Sacc., *F. lateritium* Nees. f. sp. *mori* (Desm.) Matuo et Sato, *F. moniliforme* Sheldon var. *intermedium* Neish & Laggett and *F. solani* (Mart.) Sacc. have been reported to cause leaf blight disease of mulberry in India and abroad. Among them, *Fusarium pallidoroseum* (Class: Deuteromycetes; Order: Moniliales; Family: Tuberculariaceae) is more prevalent in India, especially during rainy season (Govindaiah et al., 1990; Gupta, 2001).

Disease symptoms initiate as burning or browning/blackening of mulberry leaves at the margin, later spreading towards mid-rib and leading to defoliation. On severity, sometimes the whole twig/branch gets affected and becomes feeble and fragile with irregular black lesions on the stem surface, resulting in splitting and drying of the twig/branch (Govindaiah et al., 1990; Gupta, 2001).

Fusarium pallidoroseum is generally a soil inhabitant and survives in crop debris in the form of chlamydospores which act as the primary source on infection. On mulberry, it survives as mycelium, conidiophores and two types of conidia i.e., micro and macro. The internal mycelium gives rise to simple conidiophores which grow out on mulberry leaf surface in clusters and produce conidia at their tips. Single-celled microconidia are ovoid or oblong in shape, whereas multiseptate macroconidia are hyaline, elongate and filiform with pointed ends, measuring $14.3 \mu\text{m} \times 5.02 \mu\text{m}$ (Av. L $\times$ W). Macroconidia are the secondary source of infection which mainly disperse through wind. Upon settling on mulberry leaf, macroconidia germinate and produce germ tubes. A multicelled macroconidium can produce one to several germ tubes depending upon the number of cells. Scanning electron microscopic study demonstrates that the germ tubes enter the leaf tissues through open stomata without developing any specialized penetration structure. *Fusarium pallidoroseum* shows a very strong tropic response to stomata which is evident from the inclination of its germ tubes, while growing on mulberry leaf surface, towards open stomata. Even its germ tubes, when sometimes do not find stomata in its vicinity, travel for a longer distance to reach the open stomata for entering through stomatal opening (Fig. 12). However, when the macroconidia are in proximity to open stomata, they develop germ tubes from the cells closer to the stomata, which enter the stomatal opening immediately (Fig. 13). *Fusarium pallidoroseum* do not pierce mulberry leaves for direct penetration through cuticular epidermal layer (Gupta et al., 1998).

3.2.2. *Alternaria* Leaf Blight:

Alternaria alternata (Fr.) Keissler (Class: Deuteromycetes; Order: Moniliales; Family: Dematiaceae) also cause leaf blight in mulberry (Gunasekhar et al., 1992). Its occurrence is observed during summer season, especially under water stress and semi-irrigated conditions. Temperature ranging between 28 and 30 °C favours the multiplication of fungus. Occurrence of disease is observed both on mulberry seedlings and established plants as well. The disease symptoms appear as burning / drying of mulberry leaves, initiating from the leaf tip and later expanding towards the petiole with yellowish halo margin. On advancement of disease, the entire leaf lamina is covered with the symptoms and affected leaves wither and fall-off (Gunasekhar et al., 1992; Gupta, 2001).

Alternaria alternata survives on mulberry leaves as mycelium, conidiophores and conidia. Conidia, usually having 3-8 transverse septa and 1-3 longitudinal septa, are club-shaped with a short, tapered or cylindrical beak and narrow and rounded conidial apex, measuring 26-27 μm in length and 8-12 μm in width. *A. alternata* enter the leaf tissues by directly penetrating through epidermal layer. Each conidium produces more than one germ tubes which after growing on mulberry leaf surface terminate into finger-like appressoria (Fig. 14).

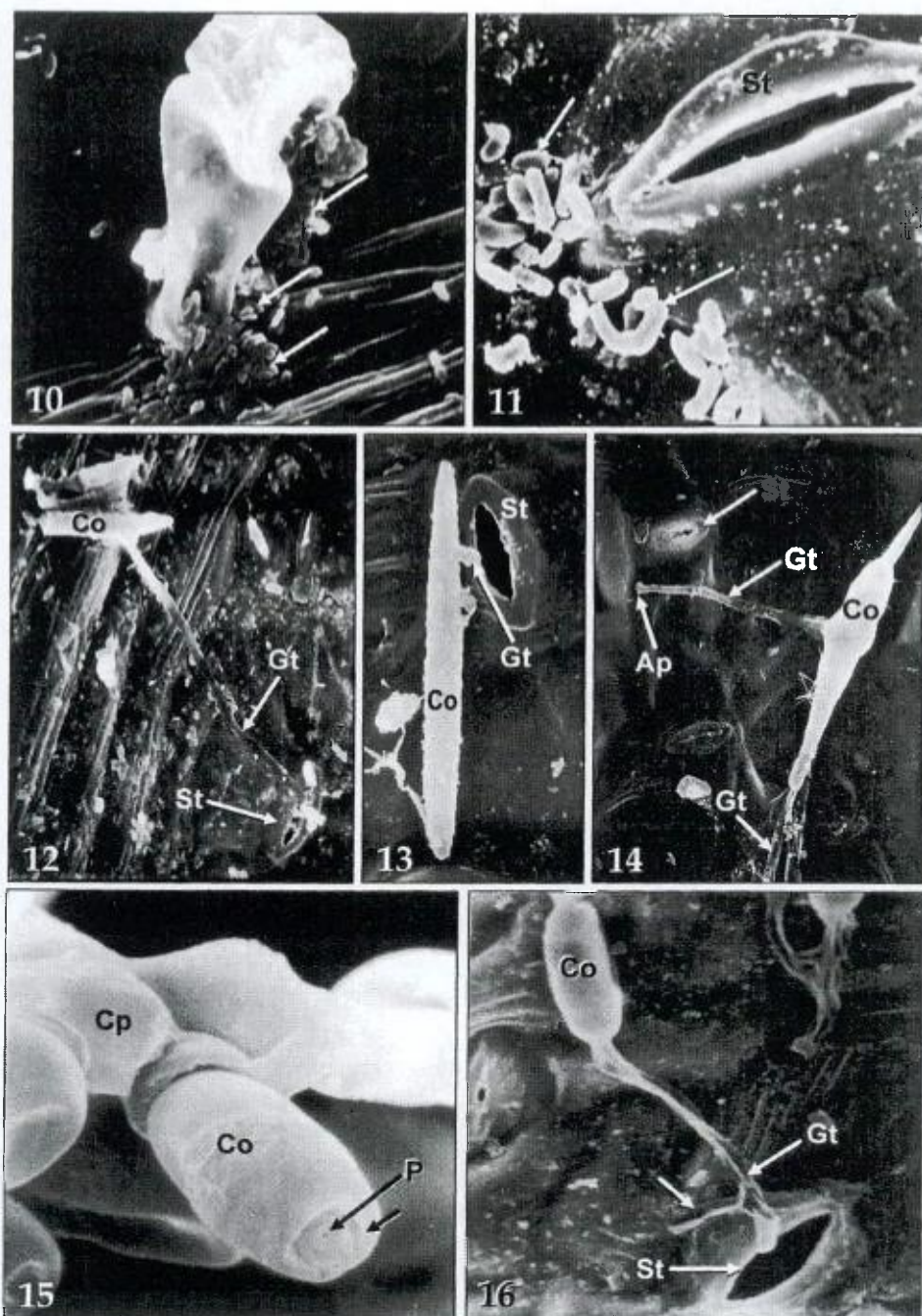


Fig. 10. Clumps of bacterial cells (arrows) of *Pseudomonas syringae* pv. *mori* at the base of epidermal appendages and in the grooves of veins on mulberry leaf.

Fig. 10. Masses de cellules bactériennes (flèches) de *Pseudomonas syringae* pv. *mori* à la base des appendices épidermiques et dans les gorges des nervures sur la feuille de mûrier.

Fig. 11. Bacterial cells (arrows) of *Pseudomonas syringae* pv. *mori* are about to invade through a stomatal opening (St) on mulberry leaf.

Fig. 11. Des cellules bactériennes (flèches) de *Pseudomonas syringae* pv. *mori* sur le point d'envahir une ouverture stomatale (St) sur la feuille de mûrier.

Fig. 12. A conidial (Co) germtube (Gt) of *Fusarium pallidroseum* penetrating through a stomatal opening after growing for a longer distance to reach a stomata (St) on mulberry leaf surface.

Fig. 12. Tube germinatif (Gt) conidien (Co) de *Fusarium pallidroseum* pénétrant par une ouverture stomatale après la croissance sur une grande distance pour atteindre un stomate (St) sur la surface de la feuille de mûrier.

Fig. 13. Multicelled conidium (Co) of *Fusarium pallidroseum* producing germtube (Gt) from its cell closer to the stomata (St).

Fig. 13. Conidie multicellulaire (Co) de *Fusarium pallidroseum* produisant un tube germinatif (Gt) à partir de sa cellule près du stomate (St).

Fig. 14. Multicelled conidia (Co) of *Alternaria alternata* produced several germ tubes (Gt) and one of them is forming an appressorium (Ap) near a stomata (St) on mulberry leaf.

Fig. 14. Conidies multicellulaires (Co) d'*Alternaria alternata* produites par plusieurs tubes germinatifs (Gt) et l'une d'elles forme un appressorium (Ap) près d'un stomate (St) sur la feuille de mûrier.

Fig. 15. Development of conidia (Co) of *Helminthosporium tetramera* on conidiophores (Cp) and a view of conidial attachment scar (arrow) with a pore (P) in its centre.

Fig. 15. Développement d'une conidie (Co) d'*Helminthosporium tetramera* sur les conidiophores (Cp) et vue de la cicatrice d'un attachement conidien (flèche) avec un pore (P) au centre.

Fig. 16. Conidial (Co) germtube (Gt) of *Helminthosporium tetramera* entering stomatal opening (St) and giving rise to secondary lateral branch (arrow) on mulberry leaf surface.

Fig. 16. Tube germinatif (Gt) conidien (Co) d'*Helminthosporium tetramera* entrant par une ouverture stomatale (St) et donnant naissance à une branche latérale secondaire (flèche) sur la surface de la feuille de mûrier.

The germ tubes form appressoria at various sites, other than stomata, on mulberry leaf surface and thus help the pathogen to pierce the epidermal layer and enter the leaf tissues. Although the germ tubes also penetrate through wounds on mulberry leaf surface, they do not penetrate directly through stomata. A single germ tube can penetrate more than one wound by giving rise to secondary lateral branches (Gupta *et al.*, 1998).

3.2.3. *Helminthosporium* leaf blight:

Leaf blight caused by *Helminthosporium tetramera* Mc. Kinney (Class: Deuteromycetes; Order: Moniliales; Family: Dematiaceae) often occurs in southern parts of India, mostly during post-rainy season. The disease initiates as withering and drying symptoms on leaf lamina, which later extend irregularly surrounded by a thin margin of light brown colour and finally turned into ash colour (Latha *et al.*, 2000).

Upon establishment of infection, *Helminthosporium tetramera* grow out on the leaf surface as clusters of septate and erect conidiophores by rupturing the epidermal layer. These conidiophores produce multicelled conidia in the clusters of two or three which emerge laterally from the base of conidiophores at regular distances. The conidia are bulbous, symmetrical in shape and slightly tapered towards the rounded ends. The conidial ends have prominent attachment scar with a pore at the center

(Fig. 15). The conidia of *H. tetramera* are the main source of infection in mulberry, which disperse through air current. On germination, each conidium mostly gives rise to two germ tubes, one each from its both ends. The germ tubes are often inclined towards open stomata and enter the leaf tissues through stomatal openings, without developing any specialized penetration structure (Fig. 16). A single germ tube can penetrate more than one stomata by producing secondary lateral branches (Kumar and Gupta, 2002).

4. LEAF SPOT

Leaf spot is another serious disease of mulberry which is widely prevalent in India. Although it occurs in almost all the mulberry growing areas of the country, its symptom appearance, etiology and severity differ with season and region. Four kinds of leaf spot disease viz., brown, black, grey and bacterial are generally observed in India. Among them, the brown leaf spot is wide in occurrence while grey leaf spot is mainly confined to north and north-eastern regions, especially Gangetic belt of West Bengal, Bihar and Uttar Pradesh. The black and bacterial leaf spots are sporadic in occurrence (Gupta, 2001).

4.1. Brown Leaf Spot:

Brown leaf spot disease is most common during rainy and post-rainy seasons (July - November) in southern part of India. The disease occurrence is greatly influenced by environmental factors. Prolonged moderate temperature (24-26 °C) with high relative humidity (70-80%) favours severe incidence of brown leaf spot. Generally, the disease affects tender leaves and its incidence decreases with the increase in leaf age. The disease symptoms initiate as small circular brownish spots which gradually increase in size and turn into dark brown necrotic spots surrounded by chlorotic yellow haloes. As disease progresses, the necrotic diseased portions enlarge, become brittle and fall-off, leading to the formation of characteristic shot-holes. On severity, the spots coalesce, resulting in yellowing and pre-mature defoliation (Siddaramaiah and Hegde, 1989; Teotia and Sen, 1994; Gupta, 2001).

Cercospora moricola Cooke (Class: Deuteromycetes; Order: Moniliales; Family: Dematiaceae) is the causal fungal pathogen of brown leaf spot in mulberry (Mitter and Tandon, 1937). It reproduces asexually by means of conidia which are borne singly on each conidiophore. Conidiophores, which arise from mycelium in clusters, grow out mainly through stomata and occasionally by rupturing the epidermal layer at the base of trichomes, leading to the formation of sporodochia (fruiting bodies) and appearance of disease symptoms. Conidia, measuring 70-30 µm in length, are 3-7 celled (multiseptate), hyaline, elongate and filiform, with bulbous base (foot cell) and tapered tip. Scanning electron microscopic study shows that the conidial attachment with conidiophores forms a ball-and-socket type joint where the bulbous base of conidia is fitted in the cup-shaped tip of conidiophores. Mature conidia detach from conidiophores on the release of their foot cells from the sockets of conidiophores (Fig. 17) (Gupta *et al.*, 1995b).

Conidia of *Cercospora moricola* mainly spread by rain splash and are the primary source of infection of brown leaf spot disease in mulberry. The conidia, on obtaining congenial conditions, germinate on the mulberry leaf surface, each producing one to several germ tubes. These germ tubes show strong tropic response to the open stomata, as they have a tendency to grow towards the open stomata and enter the leaf tissues through stomatal openings. Even if a conidium lies in the vicinity of open stomata, its cell closer to the stomatal opening germinates first and the germ tube immediately enters through stomatal opening (Fig. 18). The germ tubes also give rise to secondary lateral branches, thus a single germ tube can penetrate more than one stomata (Fig. 19). The germ tube of *C. moricola* neither form any specialized penetration structures like appressoria or infection vesicles, nor penetrate through epidermal layer. The infection of *C. moricola* is more severe when the splash-borne conidia

are carried to the lower surface of mulberry leaf, ensuring natural portal (stomata) for penetration and assured moisture for germination (Sukumar and Ramalingam, 1981; 1986; Gupta *et al.*, 1995b).

4.2. Grey Leaf Spot:

Grey leaf spot usually initiates on abaxial surface of coarse mulberry leaves as small grey to brown hyphal mats with a mildew-type appearance, which subsequently cover almost entire abaxial leaf surface with a blackish powdery mass of conidia and conidiophores, resulting in dark brown necrotic spots on adaxial leaf surface. A temperature ranging between 19 and 30° C is most favourable for the occurrence of grey leaf spot in mulberry (Biswas *et al.*, 1996).

Pseudocercospora mori (Hara) Deighton (Class: Deuteromycetes; Order: Moniliales; Family: Dematiaceae) is a causal fungus of grey leaf spot in mulberry (Srivastava and Topal, 1985). *P. mori* produces three types of hyphae - primary, internal and secondary. The internal and secondary hyphae produce conidia singly on short conidiophores, and the primary infection hyphae emerge from the conidia to cause infection. The conidia are multiseptate (3 to 17 celled), hyaline, obclavate to cylindrical, straight or slightly curved, measuring 4-35 $\mu\text{m} \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$ (L $\times$ W). The conidia germinate mostly from the end (tip and/or basal) cells and while growing on the leaf surface, on coming in contact with open stomata, they either enter directly, or often produce short lateral branches (stomatopodia) into them (Fig. 20). The proximity of stomata influences the conidial germination and penetration behaviour, as most often the germ tubes emerge from the conidial cells, even from intermediate cells, adjacent to the stomata and those germ tubes enter through stomatal openings directly (Fig. 21). More than one germ tube or stomatopodium may enter a stoma. Inside the stomata, the germ tubes or stomatopodia swell to develop into sub-stomatal vesicle-like structures (Fig. 22). On successful establishment of *P. mori* in mulberry leaf tissues, internal mycelium develops compact stromata in the substomatal chambers, each giving rise to 1-5 short, erect and unbranched conidiophores which emerge through stomata. Conidia are produced singly on each conidiophore. Stromata also give rise to secondary infection hyphae which emerge from stomata, grow and branched profusely on the leaf surface and also produce abundant conidia. Secondary infection hyphae re-enter the leaves directly through other stomata or by producing stomatopodia into them. Conidia are also produced from stomatopodia and from the substomatal infection vesicles of secondary infection hyphae. The same stomata may serve for the discharge of conidia and entry of hyphae or germ tubes (Babu *et al.*, 2002).

4.3. Black Leaf Spot:

Black leaf spot is commonly observed in southern peninsular part of India, especially during post-rainy season when the average atmospheric temperature ranges between 20 and 30° C with relative humidity of 70-80%. The Black spot disease is characterized by small dark blackish brown necrotic rectangular or polygonal spots of about 2 mm, mostly spreading on entire leaf lamina. The symptoms first appear on mature mulberry leaves and later spread upwards on young leaves. On the advancement of symptoms, the severely affected leaves become yellow and fall-off (Philip *et al.*, 1994).

Colletotrichum gloeosporioides (Penzig) Penzig & Sacc. (Class: Deuteromycetes; Order: Melanconiales; Family: Melanconiaceae) is a causal fungal pathogen of black spot in mulberry. *C. gloeosporioides* produces simple elongated conidiophores which emerge on the leaf surface abundantly in clusters by rupturing the epidermal layer, each bearing a single conidium at their tip. The conidiophores with developed conidia in acervuli (fungal fruiting bodies) mostly appear on adaxial surface of mulberry leaves. The conidia, measuring 12.2-15.9 $\mu\text{m} \times 2.8-3.75 \mu\text{m}$ (L $\times$ W), are hyaline, unicelled and ovoid or oblong in shape, having a distinct bulbous basal ends at the point of attachment to conidiophores and slightly tapered tips (Fig. 23). The conidia are the main source of infection. Each conidium, on germination, produces a single germ tube which, while growing on leaf surface, apparently inclines towards the open stomata, but extends away from closed stomata.

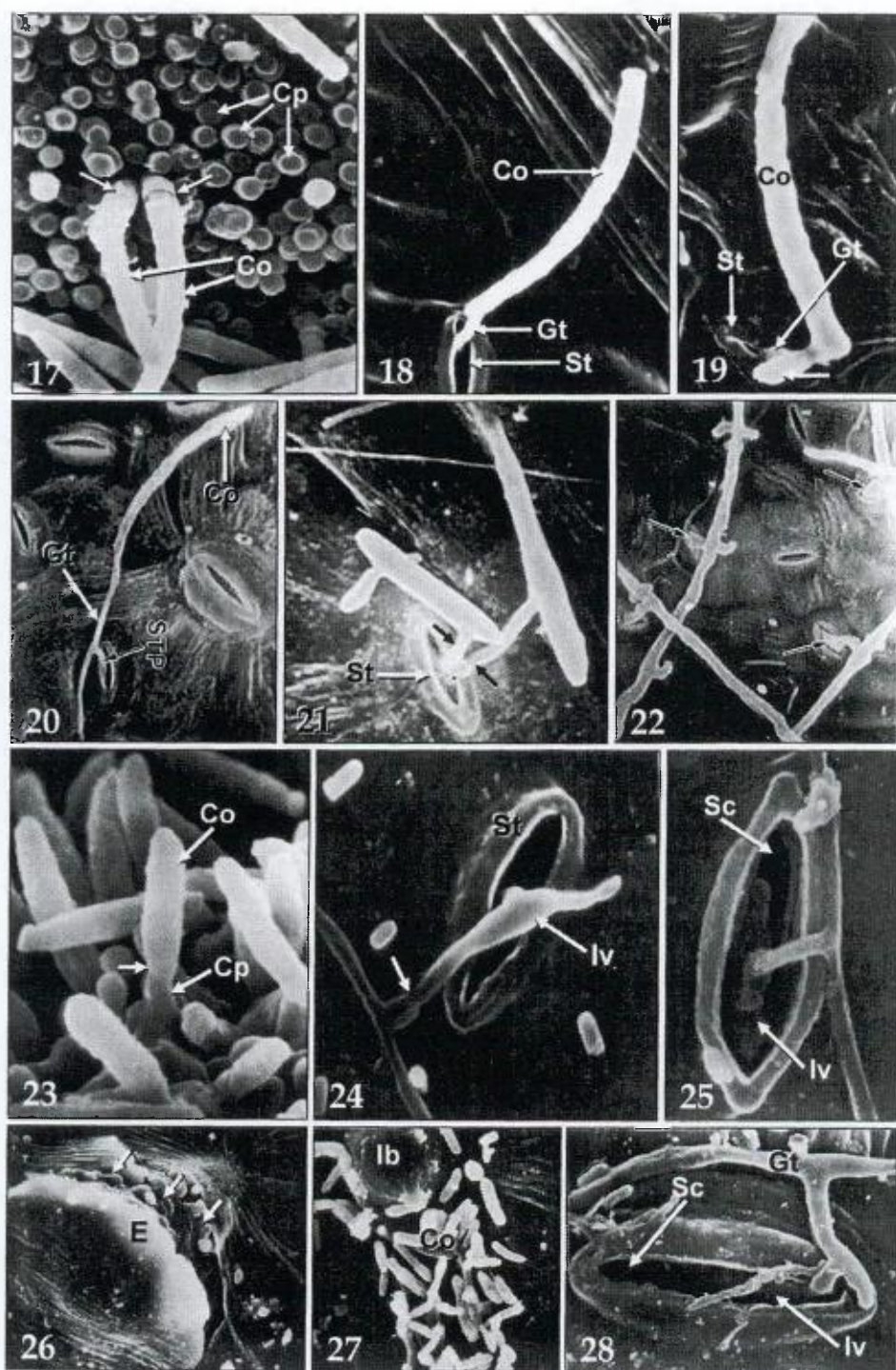


Fig. 17. Ball-and-socket type attachment of conidia and conidiophores of *Cercospora moricola*. The conidia (Co) are being released from their conidiophore sockets (arrows). Several cup-shaped tips of conidiophores (Cp) after shed out their conidia are also seen.

Fig. 17. Attachement en forme de balle de conidies et de conidiophores de *Cercospora moricola*. Les conidies (Co) sont libérées de leurs cavités conidiophores (flèches). On peut aussi voir plusieurs extrémités de conidiophores en forme de corolles (Cp) après que leurs conidies aient disparu.

Fig. 18. A multicelled conidium (Co) of *Cercospora moricola* germinated from its cell closer to the open stomata (St) and its germtube (Gt) entered through stomatal opening on mulberry leaf.

Fig. 18. Conidie multicellulaire (Co) de *Cercospora moricola* ayant germé à partir de sa cellule près d'un stomate ouvert (St) et son tube germinatif (Gt) étant entré par l'ouverture stomatale sur la feuille de mûrier.

Fig. 19. Conidial (Co) germtube (Gt) of *Cercospora moricola* entering stomatal opening (St) and giving rise to secondary lateral branch (arrow).

Fig. 19. Tube germinatif (Gt) conidien (Co) de *Cercospora moricola* entrant par l'ouverture stomatale (St) et donnant naissance à une branche latérale secondaire (flèche).

Fig. 20. Germtube (Gt) developed from the end cell of a conidium (Co) of *Pseudocercospora mori* producing a stomatopodium (STP) in a stomata from its lateral branch.

Fig. 20. Tube germinatif (Gt) s'étant développé à partir de la cellule terminale d'une conidie (Co) de *Pseudocercospora mori* produisant un stomatopodium (STP) dans un stomate à partir de sa branche latérale.

Fig. 21. Two conidial germ tubes (arrows) of *Pseudocercospora mori* entering a stomatal opening (St) on mulberry leaf.

Fig. 21. Deux tubes germinatifs conidiens (flèches) de *Pseudocercospora mori* entrant par une ouverture stomatale (St) sur la feuille de mûrier.

Fig. 22. The conidial germ tubes of *Pseudocercospora mori* developing into sub-stomatal infection vesicles (arrows).

Fig. 22. Tubes germinatifs conidiens de *Pseudocercospora mori* s'étant développés en vésicules d'infestation sub-stomatique (flèches).

Fig. 23. Lateral view of an acervulus of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf showing the attachment of bulbous ends (arrows) of conidia (Co) to the conidiophores (Cp).

Fig. 23. Vue latérale d'un acervule de *Colletotrichum gloeosporioides* sur une feuille de mûrier montrant l'attachement des extrémités bulbeuses (flèches) des conidies (Co) aux conidiophores (Cp).

Fig. 24. An infection vesicle (Iv) developed over the stomatal opening (St) from the lateral branch (arrow) of a conidial germ tube of *Colletotrichum gloeosporioides*.

Fig. 24. Vésicule d'infestation (Iv) s'étant développée sur l'ouverture stomatique (St) à partir de la branche latérale (flèche) d'un tube germinatif conidien de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Fig. 25. Conidial germ tube of *Colletotrichum gloeosporioides* developed an infection vesicle (Iv) within a stomatal cavity (Sc).

Fig. 25. Tube germinatif de *Colletotrichum gloeosporioides* s'étant développé sur une vésicule d'infestation (Iv) à l'intérieur d'une cavité stomatique (Sc).

Fig. 26. Emerging out of conidiophores (arrows) of *Colletotrichum lindemuthianum* by rupturing of epidermal layer (E) on mulberry leaf surface.

Fig. 26. Emergence de conidiophores (flèches) de *Colletotrichum lindemuthianum* par la rupture de la couche épidermique (E) sur la surface de la feuille de mûrier.

Fig. 27. Conidia (Co) of *Colletotrichum lindemuthianum* released from an acervulus near an idioblast (Ib) on mulberry leaf surface.

Fig. 27. Conidies (Co) de *Colletotrichum lindemuthianum* libérées d'un acervule près d'un idioblaste (Ib) sur la surface de la feuille de mûrier.

Fig. 28. Conidial germ tube (Gt) of *Colletotrichum lindemuthianum* developed an infection vesicle (Iv) within a stomatal cavity (Sc).

Fig. 28. Tube germinatif conidien (Gt) de *Colletotrichum lindemuthianum* ayant développé une vésicule d'infestation (Iv) à l'intérieur d'une cavité stomatique (Sc).

In the proximity of open stomata, the germ tubes usually give rise to lateral branches which terminate into specialized infection vesicles, either over the stomatal openings or within the stomatal cavities (Figs. 24 and 25). A single germ tube may penetrate more than one stomata by giving rise to secondary lateral branches. The infection vesicles produce primary infection hyphae which invade leaf tissues and thus cause infection (Kumar *et al.*, 2001b).

5. ANTHRACNOSE

Anthracnose in mulberry appears as brown to reddish-brown, round or oval eyespots on the leaf blade extending towards the leaf margin with irregular shape. Hot (28-32°C temperature) and humid (75-90% relative humidity) weather helps in prevalence of anthracnose in southern India (Janardhan *et al.*, 1996).

Colletotrichum lindemuthianum Sacc. & Magn. (Class: Deuteromycetes; Order: Melanconiales; Family: Melanconiaceae) is the causal fungal agent of anthracnose disease in mulberry (Janardhan *et al.*, 1996). The symptoms initiate with the abundant emergence of short, erect conidiophores of *C. lindemuthianum* on mulberry leaf surface, which grow out in clusters by rupturing the epidermal layer, mostly near the base of idioblasts on adaxial leaf surface (Fig. 26) and sometimes near the trichomes on abaxial leaf surface. Unicellular conidia, borne singly on the tip of conidiophores, are ovoid, hyaline, cylindrical or dumbbell-shaped, measuring 13-22 µm × 4-5 µm (L × W). The conidia have distinct bulbous base-ends at the point of attachment to the conidiophores and are slightly tapering towards the opposite end (Janardhan *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2001c).

Conidia of *Colletotrichum lindemuthianum*, which are the main source of disease spread, get released from large acervuli (Fig. 27) and disseminated by rain splash. Conidia germinate on mulberry leaf surface, each producing a single germ tube. The conidial germ tubes are usually orientated towards open stomata but not the closed ones. Even the secondary lateral branches of germ tubes also grow towards the open stomata. The germ tubes or its branches on entering into the stomatal cavities terminate into specialized infection vesicles (Fig. 28). These vesicles produce primary infection hyphae which enter the leaf tissues and cause infection. A single germ tube can penetrate more than one stomata by giving rise to several secondary lateral branches (Kumar *et al.*, 2001c).

6. SHOOT BLIGHT

Shoot blight of mulberry appears first on apical leaves as marginal burning or blackening of lamina with boat-shaped inward curling which later spread to all the leaves of affected twig. As disease progresses, the burning symptoms spread across the whole leaf lamina as irregular blackish-brown spots. Whitish crystalline pin-head size masses of bacterial exudation are commonly visible throughout the lamina on both the surfaces of affected leaves. On severity, the stems of affected shoots become flaccid, resulting in drooping of entire shoots and death of the plants.

Xanthomonas campestris pv. *mori* (Pammel) Dowson (Class: Schizomycetes; Order: Pseudomonadales; Family: Pseudomonadaceae) is the causal bacterial pathogen of shoot blight in mulberry. It is a soil inhabitant which translocates through vascular system in mulberry as the masses of bacterial cells are observed inside many of the xylem vessels of affected plants. The bacterial cells are also observed streaming from the edge of diseased tissues (Gupta *et al.*, 2001).

REFERENCES

- BABU A.M., KUMAR V. & GOVINDAIAH (2002) Surface ultrastructural studies on the infection process of *Pseudocercospora mori* causing grey leaf spot disease in mulberry. Mycol. Res., 106, 938-945.

- BISWAS S., DAS, N.K. & PAVAN KUMAR T. (1996) Influence of host genotypes, shoot age and climatic conditions on the development of *Pseudocercospora mori* in mulberry. *Sericologia*, 36, 737-742.
- GOVINDAIAH, SHARMA D.D., SINGHAL B.K. & SENGUPTA K. (1990) *Fusarium pallidroseum* (Cooke) Sacc. - A new pathogen causing leaf blight in mulberry (*Morus alba* L.). *Indian J. Seric.*, 29, 291-292.
- GUNASEKHAR V., GOVINDAIAH & DATTA R.K. (1992) A new leaf blight of mulberry (*Morus* spp.) caused by *Alternaria alternata* in India. *Indian J. Seric.*, 31, 131-134.
- GUPTA V.P. (2001) Diseases of mulberry and their management, pp. 130-164. In: *Plant Pathology*, P.C. Trivedi (Ed.), Pointer Publishers, Jaipur, India.
- GUPTA V.P., KUMAR V., MISHRA R.K., SHARMA D.D., SARKAR A. & THIAGARAJAN V. (2001) Mulberry shoot blight: Axenic culture, pathogenicity and plant-pathogen interaction. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz*, 34, 399-406.
- GUPTA V.P., RAJU H.V., KUMAR V. & GOVINDAIAH (1998) Surface ultrastructure of infection process of *Alternaria alternata* and *Fusarium pallidroseum* on mulberry. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz*, 31, 429-434.
- GUPTA V.P., TEWARI S.K. & DATTA R.K. (1994) Surface ultrastructure of uredinial stage of *Cerotelium fici* and its infection process on mulberry. *Mycopathologia*, 128, 99-104.
- GUPTA V.P., TEWARI S.K. & DATTA R.K. (1995a) Surface ultrastructural studies on ingress and establishment of *Pseudomonas syringae* pv. *mori* on mulberry leaves. *J. Phytopathol.*, 143, 415-418.
- GUPTA V.P., TEWARI S.K., GOVINDAIAH, BAJPAI A.K. & DATTA R.K. (1995b) Observations on the surface ultrastructure of conidial stage of *Cercospora moricola* and its infection process on mulberry. *Sericologia*, 35, 123-128.
- JANARDHAN J.L., PHILIP T., GOVINDAIAH, SHARMA D.D., BAJPAI A. K. & DATTA R.K. (1996) Anthracnose of mulberry - First report from India. *Sericologia*, 36, 567-571.
- KUBOMURA Y. & NAKAYAMA K. (1975) On the overwintering of the causal pathogen of a bacterial blight of mulberry, *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens in dead leaves of the mulberry. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 44, 287-293.
- KUMAR V. & GUPTA V.P. (2002) Scanning electron microscopy of ingress and infection of *Helminthosporium tetramera* in mulberry. *Indian Phytopath.*, 55, 306-307.
- KUMAR V. & GUPTA V.P. (2004) Scanning electron microscopy on the perithecial development of *Phyllactinia corylea* in mulberry - II. Sexual stage. *J. Phytopathol.*, 152, 169-173.
- KUMAR V., BABU A.M., SHARMA D.D. & DATTA R.K. (1998) Penetration and infection process of *Phyllactinia corylea* on mulberry leaf causing powdery mildew. I-Asexual stage. *J. Phytopathol.*, 146, 469-472.
- KUMAR V., DHAR A., GUPTA V.P., BABU A.M., SARKAR A. & DATTA R.K. (2001a) SEM observations on the perithecia of *Phyllactinia corylea* causing powdery mildew disease in mulberry. *International J. Indust. Entomol.*, 3, 63-67.
- KUMAR V., GUPTA V.P., BABU A.M., MISHRA, R.K., THIAGARAJAN, V. & DATTA R.K. (2001b) Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. *J. Phytopathol.*, 149, 629-633.
- KUMAR V., GUPTA V.P., BABU A.M., THIAGARAJAN V. & DATTA R.K. (2001c) Stomatal penetration and infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* causing Anthracnose disease in mulberry. *Archiv Phytopathol. Pflanzenschutz*, 34, 135-143.
- KUNOH H., KOHNO M., TASHIRO S. & ISHIZAKI H. (1980) Ultrastructural studies of powdery mildew of mulberry caused by *Phyllactinia moricola* (P.Henn.) Homma. *Fitopatol. Bras.*, 5, 11-20.
- LATHA J., PHILIP T., SHARMA D.D., CHANDRASHEKAR D.S. & GOVINDAIAH (2000) A new leaf blight disease on mulberry, caused by *Helminthosporium tetramera* Mc. Kinney. *Indian J. Seric.*, 39, 172-173.
- MAJI M.D. & QADRI S.M.H. (1999) Bacterial diseases of mulberry (*Morus* spp.). *Sericologia*, 39, 1-7.

- MITTER J.H. & TANDON R. N. (1937) Fungi of Allahabad, India. Part-III. Proc. Indian Acad. Sci., 6(B), 194-201.
- NOAMANI K.R., MUKHERJEE P.K. & KRISHNASWAMI S. (1970) Studies on the effect of feeding multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) larvae with mildew affected mulberry leaves. Indian J. Seric., 9, 49-52.
- PHILIP T., JANARDHAN L., GOVINDAIAH & BAJPAI A.K. (1994) Black leaf spot disease of mulberry – First report. Indian J. Seric., 33, 186-187.
- PRASAD K.V., DAYAKAR YADAV B.R. & SULLIA S.B. (1993) Taxonomic status of rust on mulberry in India. Curr. Sci., 65, 424-426.
- SALMON E.S. (1905) On the variation shown by conidial stage of *Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst. Ann. Mycol., 2, 18-26.
- SATO M. & TAKAHASHI K. (1973) Ecological studies on the bacterial blight of mulberry. 2. Seasonal differences of the population of *Pseudomonas mori* phase in the soil of mulberry field. 3. Some factors concerning with the survival of *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens in soil. J. Seric. Sci. Jpn, 42, 207-218.
- SIDDARAMAIAH A.L. & HEGDE R.K. (1989) Development and severity of *Cercospora* leaf spot of mulberry in relation to environmental factors. Mysore J. Agric. Sci., 23, 189-192.
- SIDDARAMAIAH A.L. & HEGDE R.K. (1990) Studies on changes in biochemical constituents of *Cercospora* infected leaves of mulberry. Mysore J. Agric. Sci., 24, 353-357.
- SRIVASTAVA S.L. & TOPAL R. (1985) A new species of *Pseudocercospora* from Garhwal Himalayas. Acta Bot. Indica, 13, 111-112.
- SUKUMAR J. & RAMALINGAM A. (1981) Splash dispersal in *Cercospora moricola*. Sci. Cult., 47, 173-175.
- SUKUMAR J. & RAMALINGAM A. (1986) Epidemiology of *Cercospora* leaf spot disease of mulberry. I. Stage of infection, spots and conidial production. Sericologia, 26, 549-553.
- SYDOW H., SYDOW P. & BULTER E.J. (1907) Fungi Indiae Orientalis. Pars II. Ann. Mycol., 5, 485-515.
- TAKAMATSU S., ISHIZAKI H. & KUNOH H. (1982) Scanning electron microscopy on perithecia of powdery mildew fungi. III. Perithecial development in mulberry powdery mildew, *Phyllactinia moricola*. Trans. Mycol. Soc. Japan, 23, 279-286.
- TEOTIA R.S. & SEN S.K. (1994) Mulberry diseases in India and their control. Sericologia, 34, 1-18.
- VIDYASAGAR G.M. & KOTRESHA D. (2003) Biochemical changes due to infection of *Phyllactinia corylea* in the leaves of certain mulberry varieties. Indian J. Seric., 42, 71-74.
- WANG H.C. (1980) Rust of mulberry (*Aecidium mori*). Nat. Sci. Counc. Mon., 8, 604-615.

EVALUATION ULTRASTRUCTURALE DE L'ENTREE, DE L'INFESTATION ET DE LA SPORULATION DE DIVERS PATHOGENES PROVOQUANT DES MALADIES FOLIAIRES CHEZ LE MURIER

V. P. GUPTA*, VINEET KUMAR, R. K. RAJAN & S. B. DANDIN

Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore – 570 008, Inde.

Les maladies ont toujours été le principal facteur restrictif pour la production de feuilles de qualité chez le mûrier (*Morus* spp.). Compte tenu de sa nature de culture vivace et de son adaptabilité climatique étendue, le mûrier est attaqué par des pathogènes variés pendant toute l'année. Ces pathogènes se perpétuent rapidement lorsque les conditions climatiques sont favorables et entraînent des dégâts étendus pour la culture du mûrier en entravant la croissance de la plante et en détériorant la qualité de la feuille. L'alimentation du ver à soie avec des feuilles malades a un effet néfaste sur la croissance et le développement des larves du ver à soie et finalement détériore les caractères commerciaux des cocons et la qualité de la soie grège (Noamani et coll., 1970 ; Siddaramaiah et Hegde, 1990 ; Gupta, 2001 ; Vidyasagar et Kotresha, 2003).

Bien que l'intensité des maladies varie avec la saison, la variété de mûrier et les pratiques de culture, les interactions entre le plant de mûrier et les pathogènes jouent un rôle majeur dans la mise en place de l'infestation et le niveau des dégâts. L'infestation réussie d'une plante hôte par un pathogène implique plusieurs étapes comme l'atterrissage, le mouvement et l'attachement du pathogène sur la surface de la plante, la reconnaissance du (des) site(s) sur la surface de la plante pour l'entrée du pathogène, l'invasion de la plante par le pathogène et la prolifération / la sporulation du pathogène sur la plante hôte. De plus, les pathogènes de nature aérienne, qui ont une accessibilité directe à la pousse de la plante, possèdent plusieurs mécanismes complexes pour surmonter les adversités sur la surface de la plante et pour provoquer l'infestation. Chez le mûrier, puisqu'il est de notoriété qu'un certain nombre de pathogènes aériens provoquent des maladies foliaires importantes, il est essentiel de comprendre le processus d'infestation complexe pour mettre au point une stratégie correcte de lutte contre la maladie. Dans cet article, nous décrivons des maladies foliaires variées du mûrier et les étapes de l'infestation, au niveau ultrastructural, par les pathogènes responsables.

1. ROUILLE DU MURIER

La maladie de la rouille est présente dans presque toutes les parties du globe où l'on cultive le mûrier. En général, deux types de symptômes de la rouille apparaissent chez le mûrier. Sous le climat sub-tropical du sud de l'Inde, la rouille de la feuille est provoquée par un pathogène fongique,

* Auteur auquel adresser la correspondance : Dr. V.P. Gupta Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore – 570 008, India. Phone: +91-821-2362992, 2362406; Cell: +91-9448165466. Fax: +91-821-2362420 / 2362845. E-mail: gupravp1010@yahoo.com, gupravpcsrsti@rediffmail.com

Cerotelium fici et est très répandue tandis que la rouille rouge provoquée par un autre pathogène fongique, *Aecidium mori* domine sous un climat tempéré en Inde et dans d'autres parties du globe.

1. 1. Rouille de la feuille :

La maladie de la rouille de la feuille existe dans le sud de la péninsule indienne pendant et après la saison des pluies et en hiver. La température comprise entre 22 et 26°C avec une humidité relative élevée au-dessus de 70 % est très propice à la présence de la rouille. La maladie se manifeste par de nombreuses petites taches marron de la taille de la tête d'une épingle sur la surface adaxiale (supérieure) des feuilles de mûrier en même temps que l'éruption de pustules marron à noir sur la surface abaxiale (inférieure), ce qui entraîne le jaunissement, le dessèchement et la défoliation prématurée. La rouille de la feuille atteint les plants de mûrier au dernier stade de leur croissance (en général 50 jours après la taille), car les feuilles mûres sont plus sujettes à la maladie que les feuilles tendres, ce qui entraîne un manque en feuillage pendant l'élevage du dernier âge du ver à soie (Gupta, 2001).

Cerotelium fici Cast. (Arth.) (Classe : Basidiomycetes ; Ordre : Uredinales ; Famille : Uredinaceae) est le pathogène responsable de la rouille de la feuille (Sydow et coll., 1907). Cependant, il est aussi identifié comme *Peridiospora mori* Barclay (Prasad et coll., 1993). C'est un champignon microcyclique obligé qui survit sur le mûrier comme mycelium, uredinia (ou uredia) et urediniospores (ou uredospores). Les uredinia (corps fruitiers) apparaissent en général comme des taches marron ovales ou allongées qui se produisent principalement sur la surface abaxiale de la feuille de mûrier mais plus tard en même temps que d'autres uredinia également sur la surface adaxiale. L'étude ultrastructurale révèle que les uredinia matures avec un peridium cellulaire renferment de nombreuses urédiospores subsessiles aux parois très épaisses. Le mycelium en ramification et la production ultérieure de structures stériles connues comme des paraphyses et des urédiniospores abondantes aident à rompre l'épiderme et à libérer les urédiniospores (Fig. 1). Les urédiniospores sont échinulées (épineuses), globoides ou largement ellipsoïdales, et mesurent 15 à 18 µm × 12-15 µm (L × l). La surface ornementale des urédiniospores porte des épines coniques, chacune se matérialisant par une petite dépression circulaire avec un anneau légèrement élevé. Ces épines sont distribuées régulièrement sur toute la surface de la spore, sauf sur l'hile (la cicatrice de détachement du pédicelle). Chaque urédiniospore a 3 à 4 pores germinatifs déprimés parsemés sur sa surface (Fig. 2). Les tubes germinatifs émergent de ces pores germinatifs et s'étendent sur la surface de la feuille de mûrier avant de terminer en structures de pénétration caractéristiques appelées les appressoria. A l'inverse de la plupart des champignons de la rouille, *Cerotelium fici* pénètre directement les feuilles de mûrier en perçant la couche épidermique et non pas par les stomates. Cependant ses tubes germinatifs passent par-dessus les stomates (Fig. 3), mais ne forment pas d'appressoria par-dessus le stomate ni n'entrent par les ouvertures stomatales. L'appressorium hyalin et gonflé développe un sillon sur sa surface inférieure, qui donne naissance à des crochets de pénétration ou à des hyphes d'infestation primaire (Fig. 4). Ces hyphes percent la cuticule de la feuille et l'épiderme et entrent ainsi dans les tissus de la feuille et provoquent l'infestation (Gupta et coll., 1994).

Les urédiniospores restent viables pendant plusieurs mois dans des conditions favorables et se dispersent par les gouttes d'eau et le vent. La dissémination du pathogène à longue distance se produit avec les urédiniospores aériens.

1. 2. Rouille rouge :

La rouille rouge est plus présente en Chine, au Japon, en Corée et dans d'autres pays sub-tropicaux cultivant le mûrier. Cependant, en Inde, on l'observe occasionnellement dans les régions du nord et du nord-est. La rouille rouge atteint les jeunes bourgeons, les feuilles, les pétioles et les pousses. Lors de l'infestation, les bourgeons gonflent et se recourbent dans une forme anormale et donnent naissance à plusieurs taches jaunes légèrement protubérantes. Les symptômes sur les feuilles apparaissent

comme de nombreuses petites taches protubérantes, rondes, jaune brillant sur les deux surfaces et sur la tige et sur les pétioles comme des lésions rouge brique (Wang, 1980 ; Teotia et Sen, 1994).

Aecidium mori (Sydow & Butler) Barclay (Classe : Basidiomycetes ; Ordre : Uredinales ; Famille : Uredinaceae) entraîne la rouille rouge chez le mûrier (Sydow et coll., 1907). C'est un champignon de la rouille microcyclic typique qui se reproduit sexuellement et existe sur le mûrier principalement sous forme de mycelium, d'écides et d'écidiospores. Les écides d'*A. mori* sont cupulés et de couleur orange-jaune et renferment de nombreuses écidiospores. Les écidiospores à paroi épaisse sont principalement binucléées avec une surface échinulée. Les écidiospores se libèrent des écides cupulés et se dispersent principalement par le vent. Lors de la germination, les écidiospores produisent des tubes germinatifs relativement plus courts qui pénètrent les feuilles de mûrier soit en perçant directement la cuticule de la feuille soit par les ouvertures stomatales. Alors que l'infestation progresse, le mycelium cloisonné d'*A. mori* croît à la fois de manière inter et intracellulaire à l'intérieur des tissus de l'hôte et envoie les haustoria dans les cellules pour absorber les nutriments. *A. mori* se déplace par des faisceaux vasculaires pour provoquer les symptômes sur les pousses et les pétioles (Wang, 1980).

Une température d'environ 24°C est des plus propices pour l'éruption de la maladie de la rouille rouge chez le mûrier. *Aecidium mori* surmonte les conditions défavorables en tant que mycelium ou écidiospores dans les écides sur les vieilles parties des plantes ou dans les débris des plantes mortes. Les écidiospores en hibernation agissent comme source primaire de l'infestation dans des conditions météorologiques favorables (Wang, 1980 ; Teotia et Sen, 1994).

2. OIDIUM

L'oïdium est répandu dans tous les pays cultivant le mûrier. Cependant, son incidence et son intensité varient en fonction des régions et des saisons. Il est plus sévère après la saison des pluies jusqu'à l'hiver sous les tropiques et du printemps à l'automne dans les régions tempérées. La maladie est caractérisée par l'apparition de taches poudreuses blanches ou gris cendré sur la surface abaxiale des feuilles de mûrier. Alors que l'infestation avance, les taches poudreuses se répandent sur toute la surface abaxiale et deviennent noires tandis que la partie correspondante sur la surface adaxiale de la feuille développe des lésions chlorotiques (Gupta, 2001).

Un parasite obligé, *Phyllactinia corylea* (pers.) Karst. (Classe : Ascomycetes ; Ordre : Erysiphales ; Famille : Erysiphaceae) est un agent responsable de l'oïdium chez le mûrier (Salmon, 1905). Au Japon, on l'a aussi identifié sous le nom de *Phyllactinia moricola* (P. Henn.) Homma. Le développement et la distribution de *Phyllactinia corylea* (= *Phyllactinia moricola*) sont très influencés par les facteurs environnementaux qui ont un grand impact sur la germination des spores, sa croissance, sa reproduction, sa sporulation et sa dissémination. En fonction des conditions environnementales, *P. corylea* peut se reproduire à la fois par des méthodes asexuées et sexuées. Il se reproduit de manière asexuée aux moyens de conidies dans les conditions tropicales et subtropicales, tandis qu'il hiberne en développant des périthèces et se reproduit sexuellement au moyen des ascospores dans les conditions climatiques tempérées (Kunoh et coll., 1980 ; Takamatsu et coll., 1982 ; Kumar et coll., 1998 ; Kumar et Gupta, 2004).

Phyllactinia corylea se comporte de manière exoparasitaire sur les feuilles de mûrier, puisqu'il croît de manière externe sur la surface abaxiale de la feuille et entre dans les tissus foliaires par les stomates ouverts. *P. corylea* produit un mycelium hyalin qui donne naissance à des conidiophores perpendiculaires, droits ou enroulés en spirales, chacun portant un conidium unique à son extrémité (Fig. 5). Les conidies matures sont hyalines, unicellulaires et clavées, et mesurent 40 µm × 12 µm (moyenne L × l). Les études de microscopie électronique par balayage révèlent que la surface conidiale est ornée avec des protrusions en forme d'épines distribuées régulièrement qui pourraient aider les conidies à adhérer à la surface abaxiale de la feuille (Fig. 6). Les conidies se dispersent principalement par le vent. Les conidies hyalines, lorsqu'elles germent sur la surface abaxiale de la

feuille, produisent des tubes germinatifs qui après s'être répandus sur la surface de la feuille se terminent en corps d'adhérence lobés. Les corps d'adhésion donnent naissance à des hyphes d'infestation qui croissent de manière extensive sur la surface de la feuille et produisent plusieurs branches courtes, latérales avec ou sans corps d'adhésion à leurs sommets. L'étude topographique de la surface révèle que les branches latérales qui se forment près des stomates, connus comme des stomatopodies, envahissent la feuille par des ouvertures stomatales et ne forment pas de corps d'adhésion tandis que celles qui sont éloignées des stomates se terminent en corps d'adhésion et aident le mycelium fongique à adhérer à la surface de la feuille (Fig. 7). Les stomatopodies continuent à croître comme des hyphes internes dans les espaces intercellulaires des tissus foliaires. Les hyphes intercellulaires donnent naissance à des haustoria pour absorber les nutriments à partir des tissus de la feuille (Kunoh et coll., 1980 ; Kurmar et coll., 1998).

Phyllactinia corylea commence à se reproduire sexuellement en développant des perithèces, quand la production conidiale ralentit pour cesser en raison des changements des conditions climatiques à la fin de l'été dans les zones tempérées. De jeunes perithèces blanches commencent à apparaître sur le mycelium blanc de *P. corylea* sur les feuilles de mûrier, qui plus tard deviennent orange à rouge brique et finalement noirs quand ils arrivent à maturité.

Les études ultrastructurales révèlent que le développement périthécial commence avec l'enroulement de deux courtes structures spécialisées, l'anthéridie (mâle) et l'ascogone (femelle) qui émergent de deux hyphes séparées. Lorsqu'elles s'enroulent l'une sur l'autre, ces structures fusionnent ensemble pour se développer en primordium périthécial en forme d'œuf. Lors du développement ultérieur des couches de la paroi, les primordia périthéciaux se développent en forme de balles recouvertes par des cellules de la paroi avec des bords clairs. A ce stade du développement périthécial, de nombreuses hyphes émergent des cellules gonflées de la paroi sur la surface inférieure (près de la base) des perithèces immatures en forme de balle, qui irradiant sur la surface de la feuille et aident ainsi les perithèces à se fixer à la surface (Fig. 8). A un stade encore plus avancé de maturation, les cellules de la paroi supérieure des perithèces commencent à gonfler tandis que les cellules de la paroi aux niveaux périthéciaux équatoriaux rétrécissent. Plus tard, les cellules gonflées s'allongent et finalement se développent en cellules pénicillées caractéristiques avec des bases cylindriques et environ 10 projections comme des stérigma à leurs sommets. Quand les perithèces se couronnent avec des cellules pénicillées immatures, certaines des cellules de la paroi précédemment rétrécies aux niveaux périthéciaux équatoriaux donnent naissance à des appendices aciculaires avec des bases ballonnées (Fig. 9). Lorsque les perithèces mures sèchent, les appendices aciculaires se plient et poussent les perithèces au-dessus du substrat et les aident à se libérer. Les projections apicales comme des stérigma des cellules pénicillées des perithèces mures sécrètent une substance granulaire comme une pâte par leurs ouvertures apicales, ce qui permet aux perithèces dispersés de s'attacher aux feuilles et aux branches de mûrier. Les asques se libèrent par la division des perithèces séchées, qui plus tard libèrent des ascospores pendant les conditions favorables (Takamatsu et coll., 1982 ; Kumar et coll., 1998 , 2001a ; Kumar et Gupta, 2004).

3. FLETRISSURE DE LA FEUILLE

La flétrissure de la feuille chez le mûrier est provoquée à la fois par des bactéries et des champignons. On a rapporté sa présence dans presque tous les pays cultivant le mûrier. Elle provoque des dégâts sévères pour le feuillage du mûrier en détruisant le limbe de la feuille. Cependant, différents types de symptômes de la flétrissure apparaissent sur le mûrier, en fonction du comportement du pathogène et des conditions environnementales.

3. 1. Flétrissure bactérienne de la feuille :

La flétrissure bactérienne de la feuille de mûrier est présente dans le monde entier. En Inde, on a rapporté sa présence dans tous les états où le mûrier est cultivé. Une humidité relative élevée

persistante ($\sim 80\%$) et une température fluctuante ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) pendant la saison des pluies favorisent le développement de la maladie. Le sol est la source primaire de propagation de la maladie et l'infestation secondaire se produit avec les activités d'irrigation et de culture (Sato et Takahashi ; 1973 ; Maji et Qadri, 1999).

La maladie commence à apparaître comme de petites taches marron irrégulières gorgées d'eau sur le limbe de la feuille qui plus tard se fondent pour former des zones nécrotiques plus grandes, irrégulières marron très foncé, donnant une apparence de flétrissure. Sur la surface inférieure de la feuille, une brillance typique est associée avec les symptômes en raison du suintement bactérien. Avec l'avancée de la maladie, les nervures et les petites nervures deviennent aussi nécrotiques, ce qui entraîne l'enroulement et le pourrissement des feuilles. En raison de l'infestation, les plus jeunes feuilles se froissent, se tordent et se courbent vers l'extérieur et se détachent prématurément. Sur la tige, l'infestation apparaît comme des lésions irrégulières d'où se libère un suintement bactérien (Gupta, 2001).

La bactérie responsable est *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (Boyer et Lambert) Young et coll., (Classe : Schizomycetes ; Ordre : Pseudomonadales ; Famille : Pseudomonadaceae). C'est une bactérie gram négative, en forme de crochet et motile, qui mesure $1,8 - 4,5\ \mu\text{m} \times 0,9 - 1,4\ \mu\text{m}$ ($L \times l$). Elle hiberne en général dans les tissus malades, sur la plante ou sur les débris de plantes dans le sol. En raison de son point de mort thermique élevé (52°C), elle peut survivre même dans le sol sec pendant une longue période de 3 à 4 mois (Sato et Takahashi, 1973 ; Kubomura et Nakayama, 1975 ; Teotia et Sen, 1994 ; Maji et Qadri, 1999).

Pseudomonas syringae pv. *mori* préfère les rainures des nervures et la base des appendices épidermiques des feuilles de mûrier pour sa multiplication (Fig. 10). Les cellules bactériennes accumulées se dispersent par les éclaboussures de pluie, le vent et les insectes. Puisque les bactéries ne produisent pas de tube germinatif et d'appressoria, elles ne peuvent pas pénétrer la couche cuticulaire des tissus des plantes. *Pseudomonas syringae* pv. *mori* envahit les feuilles de mûrier par les ouvertures naturelles telles que les stomates (Fig. 11), les hydathodes et les cystolithes et aussi par les blessures provoquées par le vent, la pluie et les attaques d'insectes (Teotia et Sen, 1994 ; Gupta et coll., 1995a).

3.2. Flétrissure fongique de la feuille :

On a rapporté que les espèces de *Fusarium*, *Alternaria* et *Helminthosporium* entraînent la flétrissure de la feuille chez le mûrier. Parmi ces pathogènes fongiques, *Fusarium* spp. sont présents dans le monde entier en l'occurrence chez le mûrier, tandis qu'*Alternaria* et *Helminthosporium* sont en général confinés à l'Inde, surtout dans la zone péninsulaire du sud. Bien que ces pathogènes fongiques entraînent la maladie de la flétrissure de la feuille chez le mûrier, ils diffèrent pour le commencement des symptômes, la saison de prédilection et la sévérité de la maladie.

3. 2. 1. Flétrissure fusarium de la feuille :

On a rapporté que plusieurs espèces de *Fusarium*, c'est à dire *F. pallidoroseum* (Cooke) Sacc., *F. lateritium* Nees. f. sp., *mori* (Desm) Matuo et Sato, *F. moniliforme* Sheldon var. *intermedium* Neish & Laggett et *F. solani* (Mart.) Sacc. entraînent la maladie de la flétrissure de la feuille du mûrier en Inde et à l'étranger. Parmi elles, *Fusarium pallidoroseum* (Classe : Deuteromycetes ; Ordre : Moniliales ; Famille : Tuberculariaceae) est plus présente en Inde, surtout pendant la saison des pluies (Govindaiah et coll., 1990 ; Gupta, 2001).

Les symptômes de la maladie commencent par la brûlure ou le brunissement / le noircissement des feuilles de mûrier au bord, qui se propagent plus tard vers la nervure médiane et entraînent la défoliation. Lors d'attaques sévères, parfois la brindille / la branche entière sont affectées et deviennent faibles et fragiles avec des lésions noires irrégulières sur la surface, ce qui entraîne la division et le dessèchement de la brindille / de la branche (Govindaiah et coll., 1990 ; Gupta, 2001).

Fusarium pallidroseum est en général présent dans le sol et survit dans les débris de culture, sous la forme de chlamydospores qui agissent comme la source primaire de l'infestation. Sur le mûrier, il survit sous forme de mycelium, conidiophores et de deux types de conidies, les micro et les macro. Le mycelium interne donne naissance à de simples conidiophores qui croissent sur la surface de la feuille de mûrier en groupes et produisent des conidies à leurs extrémités. Les micro-conidies uni-cellulaires sont de forme ovoïde ou oblongue tandis que les macroconidies multi-cloisonnées sont hyalines, allongées et filiformes avec des extrémités pointues, mesurant $14,3 \mu\text{m} \times 5,02 \mu\text{m}$ (Moy. $L \times l$). Les macroconidies, la source secondaire de l'infestation, se dispersent principalement par le vent. Lorsqu'elles s'installent sur la feuille de mûrier, les macroconidies germent et produisent des tubes germinatifs. Une macro-conidie peut produire un à plusieurs tubes germinatifs en fonction du nombre de cellules. L'étude au microscope électronique montre que les tubes germinatifs entrent dans les tissus de la feuille par les stomates ouverts sans développer de structure de pénétration spécialisée. *Fusarium pallidroseum* montre une réponse tropique très forte aux stomates qui est évidente d'après l'inclinaison de ses tubes germinatifs tout en poussant sur la surface de la feuille de mûrier vers les stomates ouverts. Même ses tubes germinatifs, quand ils ne trouvent pas de stomates à proximité se déplacent sur une plus grande distance pour atteindre les stomates ouverts et entrer par l'ouverture stomatale (Fig. 12). Cependant, quand les macroconidies sont proches des stomates ouverts, elles développent des tubes germinatifs à partir des cellules proches des stomates, qui entrent dans l'ouverture stomatale immédiatement (Fig. 13). *Fusarium pallidroseum* ne perce pas les feuilles de mûrier pour la pénétration directe de la couche épidermique cuticulaire (Gupta et coll., 1998).

3. 2. 2. Flétrissure de la feuille *Alternaria* :

Alternaria alternata (Fr.) Keissler (Classe : Deuteromycetes ; Ordre : Moniliales ; Famille : Dematiaceae) provoque aussi la flétrissure de la feuille chez le mûrier (Gunasekhar et coll., 1992). On observe sa présence en été, surtout sous un stress hydrique et dans des conditions de semi-irrigation. Une température comprise entre 28 et 30° C favorise la multiplication du champignon. On observe la présence de la maladie à la fois sur les plantules de mûrier et aussi sur les plants établis. Les symptômes de la maladie apparaissent comme une brûlure / un dessèchement des feuilles de mûrier, commençant par l'extrémité de la feuille et plus tard s'étendant vers le pétiole avec un bord auréolé jaunâtre. Avec l'avancée de la maladie, le limbe entier de la feuille est recouvert par les symptômes et les feuilles atteintes se flétrissent et tombent (Gunasekhar et coll., 19923 ; Gupta, 2001).

Alternaria alternata survit sur les feuilles de mûrier en tant que mycelium, conidiophores et conidies. En général, les conidies ont 3-8 septes transversales et 1-3 septes longitudinales, sont en forme de massue avec un bec court, fuselé ou cylindrique et étroit, un sommet conidien arrondi, mesurant $26-27 \mu\text{m}$ de longueur et 8 à $12 \mu\text{m}$ de largeur. *A. alternata* entre dans les tissus de la feuille en pénétrant directement par la couche de l'épiderme. Chaque conidie produit plus d'un tube germinatif qui après avoir crû sur la surface de la feuille de mûrier se termine en appressoria comme des doigts (Fig. 14).

Les tubes germinatifs forment des appressoria dans des endroits variés, ailleurs que dans les stomates sur la surface de la feuille de mûrier et aident ainsi le pathogène à percer la couche épidermique et à entrer dans les tissus de la feuille. Bien que les tubes germinatifs pénètrent aussi par les blessures sur la surface de la feuille de mûrier, ils ne pénètrent pas directement par les stomates. Un tube germinatif unique peut pénétrer plus d'une blessure en donnant naissance à des branches latérales secondaires (Gupta et coll., 1998).

3. 2. 3. Flétrissure de la feuille *Helminthosporium* :

La flétrissure de la feuille provoquée par *Helminthosporium tetramera* Mc. Kinney (Classe : Deuteromycetes ; ordre : Moniliales ; Famille : Dematiaceae) se produit souvent dans les parties du sud de l'Inde, principalement pendant la saison après les pluies. La maladie commence par des symptômes de flétrissure et de dessèchement sur le limbe de la feuille, qui plus tard s'étendent

irrégulièrement et sont entourés par un bord fin d'une couleur marron clair et finalement deviennent cendrés (Latha et coll., 2000).

Lorsque l'infestation s'établit, *Herminthosporium tetramera* croît sur la surface de la feuille comme des groupes de conidiophores cloisonnés et droits en rompant la couche épidermique. Ces conidiophores produisent des conidies à plusieurs cellules en groupes de deux ou trois qui émergent latéralement de la base des conidiophores à des distances régulières. Les conidies sont bulbeuses, de forme symétrique et légèrement fuselées vers les extrémités arrondies. Les extrémités conidiennes ont une cicatrice d'attachement proéminente avec un pore au centre (Fig. 15). Les conidies de *H. tetramera* sont la principale source de l'infestation chez le mûrier, qui se dispersent par les courants d'air. Lorsqu'elles germent, chaque conidie donne principalement naissance à deux tubes germinatifs, un à chacune des deux extrémités. Les tubes germinatifs sont souvent inclinés vers les stomates ouverts et entrent dans les tissus de la feuille par les ouvertures stomatales, sans développer de structure de pénétration spécialisée (Fig. 16). Un tube germinatif unique peut pénétrer plus d'un stomate en produisant des branches latérales secondaires (Kumar et Gupta, 2002).

4. TACHE DE LA FEUILLE

La tache de la feuille est une autre maladie sévère du mûrier qui est très présente en Inde. Bien qu'elle se produise dans presque toutes les zones de culture du mûrier du pays, l'apparition des symptômes, l'étiologie et la sévérité diffèrent avec la saison et la région. En Inde, on observe quatre types de maladie de la tache de la feuille, c'est à dire marron, noir, grise et bactérienne. Parmi elles, la tache de la feuille marron se produit souvent tandis que la tache de la feuille grise est principalement confinée aux régions du nord et du nord-est, surtout dans la région autour du Gange du Bengale ouest, du Bihar et de l'Uttar Pradesh. Les taches de la feuille noire et bactérienne se produisent de manière sporadique (Gupta, 2001).

4. 1. Tache de la feuille marron :

La maladie de la tache de la feuille marron est la plus courante pendant les saisons des pluies et après les pluies (juillet – novembre) dans le sud de l'Inde. L'arrivée de la maladie est très influencée par les facteurs environnementaux. La température modérée prolongée (24-26° C) avec une humidité relative élevée (70 à 80 %) favorise l'incidence sévère de la tache de la feuille marron. En général, la maladie atteint les feuilles tendres et son incidence est moindre lorsque la feuille vieillit. Les symptômes de la maladie commencent par de petites taches circulaires marron qui augmentent progressivement en taille et deviennent des taches nécrotiques marron foncé entourées par des auréoles chlorotiques jaunes. Alors que la maladie progresse, les parties malades nécrotiques s'agrandissent, deviennent cassantes et tombent, ce qui entraîne la formation de poinçons caractéristiques. En cas d'attaque sévère, les taches fusionnent, ce qui entraîne le jaunissement et la défoliation prématurée (Siddaramaiah et Hegde, 1989 ; Teotia et Sen, 1994 ; Gupta, 2001).

Cercospora moricola Cooke (Classe : Deuteromycetes ; Ordre : Moniliales ; Famille : Dematiaceae) est le pathogène fongique responsable de la tache de la feuille marron chez le mûrier (Mitter et Tandon, 1937). Il se reproduit de manière asexuée aux moyens de conidies qui sont portées séparément sur chaque conidiophore. Les conidiophores, qui émergent du mycelium en groupes, croissent principalement par les stomates et occasionnellement en rompant la couche épidermique à la base des trichomes, ce qui entraîne la formation des sporodoches (corps fructifères) et l'apparition des symptômes de la maladie. Les conidies, mesurant de 70 à 30 µm de longueur, ont 3 à 7 cellules (multi-cloisonnées), sont hyalines, allongées et filiformes, avec une base bulbeuse (cellule du bas) et une extrémité en pointe. L'étude au microscope électronique à transmission montre que l'attachement conidien avec les conidiophores forme une articulation de type sphère/cavité où la base bulbeuse des conidies est installée à l'extrémité en forme de coupe des conidiophores. Les conidies matures se

détachent des conidiophores, à la libération de leurs cellules extrêmes des cavités des conidiophores (Fig. 17) (Gupta et coll., 1995b).

Les conidies de *Cercospora moricola* se dispersent principalement par les éclaboussures de pluie et sont la principale source de l'infestation par la maladie de la tache de la feuille marron chez le mûrier. Les conidies, lors de la présence de conditions propices, germent sur la surface de la feuille de mûrier, et produisent chacune un à plusieurs tubes germinatifs. Ces tubes germinatifs montrent une forte réponse tropique aux stomates ouverts, puisqu'ils ont une tendance à croître vers les stomates ouverts et à entrer dans les tissus de la feuille par les ouvertures stomatales. Si une conidie se trouve dans la proximité de stomates ouverts, sa cellule proche de l'ouverture stomatale germe en premier et le tube germinatif entre immédiatement par l'ouverture stomatale (Fig. 18). Les tubes germinatifs donnent aussi naissance à des branches latérales secondaires et un tube germinatif peut donc pénétrer plus d'un stomate (Fig. 19). Le tube germinatif de *C. moricola* ne forme pas de structures de pénétration spécialisée comme les appressoria ou de vésicules d'infestation, ni ne pénètre par la couche épidermique. L'infestation par *C. moricola* est plus sévère quand les conidies transportées par les éclaboussures se posent sur la surface inférieure de la feuille de mûrier, assurant le portail naturel pour la pénétration et l'humidité assurée pour la germination (Sukumar et Ramalingam, 1981 ; 1986 ; Gupta et coll., 1995b).

4.2. Tache de la feuille grise :

La tache de la feuille grise commence au début sur la surface abaxiale des feuilles de mûrier rugueuses avec de petites bosses hyphales grises à marron avec une apparence de mildiou, qui par la suite recouvrent presque toute la surface abaxiale de la feuille avec une masse poudreuse noirâtre de conidies et conidiophores, ce qui entraîne des taches nécrotiques marron foncé sur la surface adaxiale de la feuille. Une température comprise entre 19 et 30° C est plus favorable à l'éruption de la tache de la feuille grise chez le mûrier (Biswas et coll., 1996).

Pseudocercospora mori (Hara) Deighton (Classe : Deuteromycetes ; Ordre : Moniliales ; Famille : Dematiaceae) est un champignon responsable de la tache de la feuille grise chez le mûrier (Srivastava et Topal, 1985). *P. mori* produit trois types d'hyphes – primaires, internes et secondaires. Les hyphes internes et secondaires produisent des conidies séparément sur les conidiophores courts et les hyphes d'infestation primaires émergent des conidies pour provoquer l'infestation. Les conidies sont multicloisonnées (3 à 17 cellules), hyalines, obclavées à cylindriques, droites ou légèrement courbées, mesurant 4 à 35 µm × 1,5 – 2 µm (L × l). Les conidies germent principalement à partir des cellules du bout (extrémité et / ou base) et en croissant sur la surface de la feuille ; lorsqu'elles rentrent en contact avec les stomates ouverts, elles entrent soit directement, ou produisent souvent de petites branches latérales courtes (stomatopodies) à l'intérieur des stomates (Fig. 20). La proximité des stomates influence la germination conidiale et le comportement de pénétration puisque la plupart du temps les tubes germinatifs émergent des cellules conidiales, même des cellules intermédiaires, proches des stomates et ces tubes germinatifs entrent directement par les ouvertures stomatales (Fig. 21). Plus d'un tube germinatif ou stomatopodium peut entrer dans un stomate. A l'intérieur du stomate, les tubes germinatifs ou stomatopodes gonflent pour se développer en des structures comme des vésicules sub-stomatales (Fig. 22). Lors de l'établissement réussi de *P. mori* dans les tissus de la feuille de mûrier, un mycelium interne développe des stroma compacts dans les chambres sous-stomatales, chacun donnant naissance de 1 à 5 conidiophores courts, droits et sans branche qui émergent par les stomates. Les conidies sont produites séparément sur chaque conidiophore. Les stroma donnent aussi naissance à des hyphes d'infestation secondaires, qui émergent des stomates, croissent et se ramifient de manière abondante sur la surface de la feuille et produisent aussi des conidies abondantes. Les hyphes d'infestation secondaires rentrent à nouveau dans les feuilles directement par les autres stomates ou en produisant des stomatopodes à l'intérieur. Les conidies sont aussi produites à partir des stomatopodes et à partir des vésicules d'infestation sous-stomatales des

hyphes d'infestation secondaire. Les mêmes stomates peuvent servir pour la décharge des conidies et l'entrée des hyphes ou des tubes germinatifs (Babu et coll., 2002).

4. 3. Tache de la feuille noire :

On observe couramment la tache de la feuille noire dans la partie péninsulaire du sud de l'Inde, surtout pendant la saison après les pluies quand la température atmosphérique moyenne est comprise entre 20 et 30° C avec une humidité relative de 70 à 80 %. La maladie de la tache noire est caractérisée par de petites taches nécrotiques rectangulaires ou polygonales marron foncé d'environ 2 mm, la plupart se répandent sur le limbe entier de la feuille. Les symptômes apparaissent d'abord sur les feuilles de mûrier matures et se propagent vers le haut sur les jeunes feuilles. Avec l'avancée des symptômes, les feuilles très affectées deviennent jaunes et tombent (Philip et coll., 1994).

Colletotrichum gloeosporioides (Penzig) Penzig & Sacc. (Classe : Deutomeromycetes ; Ordre : Melanconiales ; Famille : Melanconiaceae) est un pathogène fongique responsable de la tache noire chez le mûrier. *C. gloeosporioides* produit des conidiophores simples, allongés qui émergent abondamment sur la surface de la feuille en groupes en rompant la couche épidermique, chacun portant une conidie unique à son extrémité. Les conidiophores avec des conidies développées dans les acervules (corps fructifères fongiques) apparaissent principalement sur la surface adaxiale des feuilles de mûrier. Les conidies, mesurant 12,2 à 15,9 μm $\times$ 2,8 à 3,75 μm (L $\times$ l) sont hyalines, unicellulaires et ovoïdes ou de forme oblongue, avec des extrémités basales bulbeuses distinctes au point de l'attachement aux conidiophores et des extrémités légèrement en pointe (Fig. 23). Les conidies sont la principale source de l'infestation. Chaque conidie, lorsqu'elle germe produit un tube germinatif unique qui, tout en croissant sur la surface de la feuille, s'incline apparemment vers les stomates ouverts et à l'opposé des stomates fermés.

Près des stomates ouverts, les tubes germinatifs donnent en général naissance à des branches latérales qui se terminent en vésicules d'infestation spécialisées, soit par-dessus les ouvertures stomatales ou à l'intérieur des cavités stomatales (Figs. 24 et 25). Un tube germinatif unique peut pénétrer plus d'un stomate en donnant naissance à des branches latérales secondaires. Les vésicules d'infestation produisent des hyphes d'infestation primaires qui envahissent les tissus des feuilles et entraînent donc une infestation (Kumar et coll., 2001b).

5. ANTHRACNOSE

L'antracnose chez le mûrier apparaît comme des stigma marron à rouge brique, ronds ou ovales sur le limbe de la feuille s'étendant vers le bord de la feuille avec une forme irrégulière. La chaleur (température de 28 à 32° C) et l'humidité (humidité relative de 75 à 90%) aident à la propagation de l'antracnose dans le sud de l'Inde (Janardhan et coll., 1996).

Colletotrichum lindemuthianum Sacc. & Magn. (Classe : Deuteromycetes ; Ordre : Melanconiales ; Famille : Melanconiaceae) est l'agent fongique responsable de la maladie de l'antracnose chez le mûrier (Janardhan et coll., 1996). Les symptômes commencent par l'émergence abondante de conidiophores courts, droits de *C. lindemuthianum* sur la surface de la feuille de mûrier, qui se développent en groupes en rompant la couche épidermique, la plupart près de la base des idioblastes sur la surface foliaire adaxiale (Fig. 26) et parfois près des trichomes sur la surface foliaire abaxiale. Les conidies unicellulaires, portées séparément sur l'extrémité des conidiophores sont ovoïdes, hyalines, cylindriques ou en forme de cloche, mesurant 13 à 22 μm $\times$ 4 à 5 μm (L $\times$ l). Les conidies ont des extrémités à la base bulbeuses et distinctes au niveau de l'attachement aux conidiophores et sont légèrement effilées vers l'extrémité opposée (Janardhan et coll., 1996 ; Kumar et coll., 2001c).

Les conidies de *Colletotrichum lindemuthianum*, qui sont la principale source de propagation de la maladie sont libérées à partir de grands acervules (Fig. 27) et disséminées par les éclaboussures de pluie. Les conidies germent sur la surface de la feuille de mûrier, chacune produisant un tube

germinatif unique. Les tubes germinatifs conidiens sont en général orientés vers les stomates ouverts mais pas vers les stomates fermés. Même les branches latérales secondaires des tubes germinatifs croissent aussi vers les stomates ouverts. Les tubes germinatifs ou ses branches lors de l'entrée dans les cavités stomatales se terminent en vésicules d'infestation spécialisées (Fig. 28). Ces vésicules produisent des hyphes d'infestation primaires qui rentrent dans les tissus des feuilles et provoquent une infestation. Un tube germinatif unique peut pénétrer plus d'un stomate en donnant naissance à plusieurs branches latérales secondaires (Kumar et coll., 2001c).

6. FLETRISSURE DE LA POUSSE

La flétrissure de la pousse du mûrier apparaît d'abord sur les feuilles apicales comme une brûlure marginale ou un noircissement des limbes avec un enroulement vers l'intérieur en forme de bateau qui plus tard se propage à toutes les feuilles de la brindille affectée. Alors que la maladie progresse, les symptômes de brûlure se répandent vers le limbe entier de la feuille comme des taches irrégulières noires—marron. Des masses blanc cristallin, de la taille d'une tête d'épingle, d'exsudation bactérienne sont couramment visibles sur les deux surfaces du limbe des feuilles atteintes. Lorsque la maladie est sévère, les tiges des pousses atteintes deviennent molles, ce qui entraîne l'affaissement des pousses entières et la mort des plantes.

Xanthomonas campestris pv. *mori* (Pammel) Dowson (Classe : Schizomycetes ; Ordre : Pseudomonadales ; Famille : Pseudomonadaceae) est le pathogène bactérien responsable de la flétrissure bactérienne chez le mûrier. Il habite dans le sol et se déplace par le système vasculaire chez le mûrier alors que l'on observe les masses de cellules bactériennes à l'intérieur des vaisseaux du xylème des plants affectés. On observe aussi les cellules bactériennes qui affluent du bord des tissus malades (Gupta et coll., 2001).

HEAT SHOCK RESPONSE AND ANALYSIS OF EGG PROTEINS IN NEW BIVOLTINE STRAINS OF *BOMBYX MORI*

H. B. MANJUNATHA*, A. ZAMOOD, B. C. VASUDHA & H. S. APARNA**

Department of Sericulture, Karnatak University, Dharwad 580 003, India.

In this report we have analysed thermotolerance and heat shock induced changes in embryonic protein profile of new bivoltine strains, CSR₂ and CSR₄. The different developmental stages of silkworm embryos (eggs) were subjected to heat shock at 30, 35, 40 and 45° C. The increased hatching (97.16%) over control was recorded when the embryos were exposed to mild heat shock temperature of 30° C for one hour at blastokinesis stage. The heat shock temperature of 45° C and above was found lethal as hatching percentage decreased to less than 50%. Apparently, over expression of 30 kDa (including 27, 28 and 29 kDa proteins) protein was noticed in 3-day embryos at 30° C heat shock. Synthesis of 84, 49, 22 and 21 kDa proteins was inhibited at 45° C heat shock in 4-day old embryos. The preblastokinesis and blastokinesis stages appear to be thermosensitive and late embryonic stages are thermotolerant.

Keywords: *Bombyx mori*, heat shock protein, thermotolerance, blastokinesis.

INTRODUCTION

The silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycis) a poikilothermic insect is very much sensitive to environmental insults. This leads to improper growth of embryo, poor hatching, weak larvae and production of inferior cocoons and low grade silk. Particularly tropical countries like India, where the temperature and humidity vary from season to season and region to region the sericulturists experience a great risk in rearing of silkworms. But the success and spread of silkworm rearing is due to introduction of F1 hybrids of native multivoltine (female parent) and exotic bivoltine silkworm (male parent). Even then cocoon, silk yield and quality of silk yarn remain inferior to those of temperate silkworm hybrids. Hence in order to overcome these problems, few new bivoltine strains / hybrids are evolved using Japanese thermotolerant bivoltine silkworm strains as breeding resource material (Suresh Kumar *et al.*, 2001). But no attempt has been made to determine the heat shock response in any developmental stages of these newly evolved bivoltine strains / hybrids.

Heat shock response is a universal physiological phenomenon exhibited by both prokaryotes and eukaryotes (Glover, 1982). This can be manifested by synthesis of a set of new proteins, "Heat Shock Proteins" (HSPs) or increase in the quantities of certain specific pre existing proteins in response to exposure of an organism or cell to thermal and other forms of stress. The heat shock proteins presumed to ensure survival under stressful conditions by involvement in damage protection or damage repair due to their action as molecular chaperones (Hightower, 1991). Cells which have been pre exposed to thermal stress acquire a transient resistance against the killing effect of a subsequent thermal stress and such a thermal stress is caused by an enhanced resistance of proteins against thermal denaturation

* (Correspondence : E-mail : manjunathabh@yahoo.com)

**Department of Biochemistry,

and aggregation (Kampinga, 1993). The recent approaches in genome-wide identification of HSF (heat shock factor) targeting genes provides novel insight into the role of HSF in growth, development, disease and ageing and in the complex metabolic reprogramming that occur in all cells in response to stress (Hahn *et al.*, 2004).

Further rat embryos exposed to elevated temperature (43° C for 7.5 minutes) developed severe craniofacial defects. In contrast, a nonteratogenic heat shock (42° for 10 minutes) caused embryos to acquire thermotolerance. The acquired thermotolerance was effective in protecting embryos from subsequent more severe heat treatment (Walsh *et al.*, 1987). In view of these a systematic investigation was undertaken with specific objectives, a) to determine the sensitivity of developing embryo to heat shock, b) threshold level of thermotolerance, and c) to determine the impact of heat shock on expression of heat shock proteins and degradation of other proteins.

MATERIALS AND METHODS

New bivoltine strains CSR₂ and CSR₄ cocoons were procured from Govt. seed cocoon market, Sirsi, Karnataka, India and maintained under recommended conditions until eclosion. Disease free layings were prepared selfing moths of CSR₂ and CSR₄. These layings were subjected to cold acid treatment (1.1 sp. gr. HCl; 25°C for 45 minutes) at 20 hour after oviposition not only to break the diapause but also to avoid pre heat shock in case of hot acid treatment.

On termination of diapause the eggs were incubated under managed environmental conditions until hatching. For heat shock the eggs were selected at 24 hours intervals until hatching. About 100 eggs per batch were placed separately in thin walled glass test tubes and subjected to heat shock in water bath regulated at 30, 35, 40 and 45° C with 90% humidity for 1 hour. Each set was taken in triplicate. Each experiment was repeated thrice. After heat shock all the eggs were incubated on par with control until hatching. The experimental data on hatching was analysed by employing statistical software SPSS-ANOVA.

SDS-PAGE analysis of egg proteins:

Eggs derived from each set at different temperature of heat shock after 1 hr recovery was homogenized with 30 µl of Tris-HCl buffer (pH 6.8). Egg protein extracted from an egg at 24 hours interval until hatching was subjected to SDS-PAGE (12%; Weber and Osborn, 1969). Each lane was loaded with equal amount of egg protein.

RESULTS

Determination of embryonic heat sensitivity:

The embryonic development between CSR₂ and CSR₄ bivoltine strains remain the same at 25° C as evidenced by 95.66 and 95.50% of hatching respectively. Interestingly, the percent of hatching was increased marginally to 96.50 and 97.16 over control in CSR₂ embryos heat shocked on 3 and 4 day (blastokinesis stage) at 30° C respectively. Concomitantly, CSR₄ recorded 96 percent hatching on heat shock at 3rd and 5th day. Number of larvae hatched declined at 35° C both in CSR₂ and CSR₄. The data has significant variation in all the stages over control as per ANOVA at $p < 0.05$. The percent of hatching was reduced further to 86.16 (1-day) in CSR₂ and 82.66 (4-day) in CSR₄ at 40° C. Further there was a drastic decline in hatching to less than 50 percent at 45° C in all the stages of CSR₂ and CSR₄. The lowest percentage of hatching was 38.16 and 37.83 and the highest being 52.66 (8-day) and 48.83 (7-day) in CSR₂ and CSR₄ strains respectively at 45° C. The percent of hatching recorded in all the stages of embryo at 45° C was statistically significant as it is different with that of other temperature according to ANOVA at $p < 0.05$ (Table I).

Table I. Impact of heat shock on different embryonic stages of new bivoltine hybrids, CSR₂ and CSR₄ of *Bombyx mori* as revealed by hatching.

Tableau I. Impact du choc thermique à différents stades embryonnaires de nouveaux hybrides bivoltins CSR₂ et CSR₄ de Bombyx mori sur l'éclosion.

Embryonic stages (days) Stades embryonnaires (jours)		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Treatments Traitements (° C)	Strains Souches									
25 Control / Témoin	CSR ₂	95.66a	95.66a	95.66a	95.66a	95.66a	95.66a	95.66a	95.66a	95.66a
	CSR ₄	95.50a	95.50a	95.50a	95.50a	95.50a	95.50a	95.50a	95.50a	95.50a
30	CSR ₂	95.83a	95.83a	96.50a	97.16a	95.83a	94.50a	95.33a	96.33a	94.66ab
	CSR ₄	95.00a	94.33ab	96.00a	95.83a	96.00a	94.83a	96.00a	95.83a	95.33a
35	CSR ₂	90.66b	90.00bc	89.16bc	89.50bc	88.00b	87.33b	90.16b	90.83b	91.16bc
	CSR ₄	92.66ab	90.33b	92.33b	91.16b	92.66a	92.16a	91.16b	93.66ab	92.16abc
40	CSR ₂	86.16c	90.00bc	89.16bc	87.83c	87.66b	87.33b	90.16b	90.66b	91.16bc
	CSR ₄	87.00c	85.83c	86.66c	82.66d	84.00c	86.16b	86.00c	89.33b	90.33c
45	CSR ₂	38.16d	41.00d	39.66d	41.66 ^c	42.83d	49.33c	44.00c	52.66c	49.00d
	CSR ₄	37.83d	41.33d	41.00d	43.33 ^e	42.00d	46.83c	48.83d	45.66d	45.66d

In each column mean values followed by same letter/s are not significantly different according to ANOVA at $p < 0.05$. / Dans chaque colonne les valeurs moyennes suivies par la / les même(s) lettre(s) ne sont pas significativement différentes selon l'ANOVA à $p < 0,05$.

Protein profile:

The protein profile derived from control and heat shocked embryos of CSR₂ and CSR₄ are presented in Figure 1 (A-C). A total of 14 to 16 protein bands were present in both CSR₂ and CSR₄ strains. The four major bands ascribable to vitellin-H (Fig. 1A, band a), egg specific protein (Fig. 1A, band B), vitellin-L (Fig. 1A, band c) and 30 kDa proteins (Fig. 1A, band d) were found similar in both CSR₂ and CSR₄. Notably, 62 kDa protein band was quantitatively different being more prominent in CSR₂ than CSR₄ (Figs. 1B and C). Over expression of 30kDa protein was noticed in 3-day old embryo exposed to 30° C in CSR₂ (Fig. 1A).

Comparatively, major changes were observed in 4-day old embryos of CSR₂ and CSR₄ exposed to varied heat shock temperatures. Interestingly, complete and partial inhibition of 84, 49, 22 and 21 kDa proteins was observed in CSR₄ and CSR₂ strains respectively at 45° C (Fig. 1B). However, there were no noticeable changes in any of the protein bands derived from 5-day embryo except 27 kDa protein at 45° C in CSR₄ strain. The characteristic difference of 62 kDa protein between CSR₂ and CSR₄ remained distinct at all the heat shock temperatures (Figs. 1B & C). Further, no apparent changes were observed in the protein bands until hatching at any given heat shock temperature.

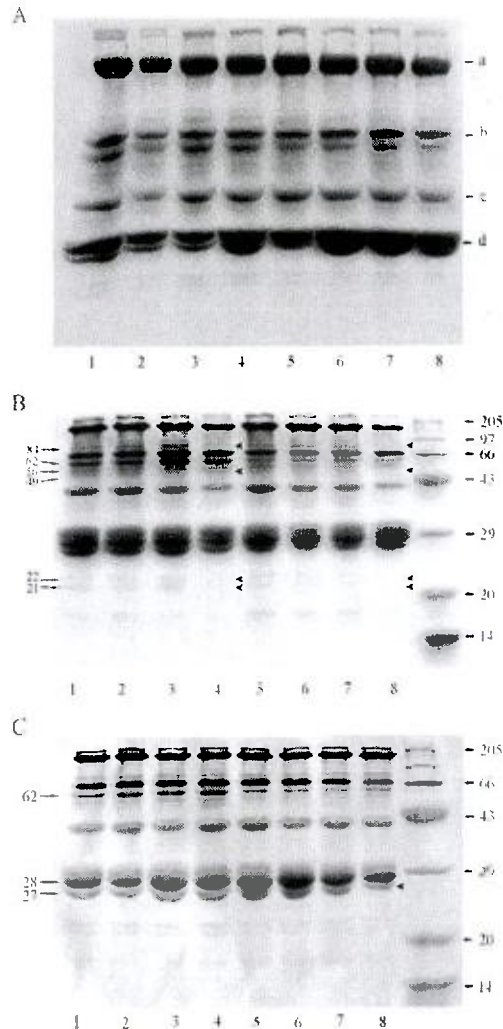


Figure 1. Protein profile derived from 3 day (A), 4 day (B) and 5 day (C) old embryos of *Bombyx mori* heat shocked at 30, 35, 40 and 45° C.

Lanes 1, 2, 3, 4 and 5, 6, 7, 8 represents CSR2 and CSR4 respectively. Approximate molecular mass (kDa) is indicated in the last lane. Arrow against protein bands represents inhibition of protein synthesis. All lanes received equal amount of egg protein extracted from an egg.

Fig. A – Lanes 1 & 5 – control (25° C); Lanes 2 & 6 – 45° C; Lanes 3 & 7 – 35° C; Lanes 4 & 8 – 30° C.

Figs. B & C. – Lanes 1 & 5 – control (25° C); Lanes 2 & 6 – 35° C; Lanes 3 & 7 – 40° C; Lanes 4 & 8 – 45° C.

Figure 1. Profil protéique d'embryons de 3 jours (A), de 4 jours (B) et de 5 jours de *Bombyx mori* traités à la chaleur à 30, 35, 40 et 45° C.

Les trajets 1, 2, 3, 4 et 5, 6, 7, 8 représentent respectivement CSR2 et CSR4. La masse moléculaire approximative (kDa) est indiquée dans le dernier trajet. La flèche en face des bandes de protéine représente l'inhibition de la synthèse des protéines. Tous les trajets reçoivent une quantité égale de protéine extraite d'un œuf.

Fig. A – Trajets 1 & 5 – témoin (25° C); Trajets 2 & 6 – 45° C; Trajets 3 & 7 – 35° C; Trajets 4 & 8 – 30° C.

Figs. B & C. – Trajets 1 & 5 – témoin (25° C); Trajets 2 & 6 – 35° C; Trajets 3 & 7 – 40° C; Trajets 4 & 8 – 45° C.

DISCUSSION

It is obvious that heat shock for an hour at varied temperatures on different developmental stages of embryo (at 24 hours intervals) yielded statistically significant results according to ANOVA at $p < 0.05$. This is in agreement with the existing opinion that the environment, temperature in particular, plays a significant role on growth and productivity of silkworm (Sujatha *et al.*, 2001 ; Howe, 1967). Here we have made correlation between the heat shock, heat shock induced over expression of 30 kDa and inhibition of protein synthesis, thermotolerance and the embryonic development index (Di), which takes into account the hatching percentage in function of the duration of development. It is evident that even heat shock for an hour at temperatures ranging from 35 to 45° C and above has great impact on embryonic development and egg protein profile in new bivoltine strains CSR2 and CSR4. The early embryonic stages until end of blastokinesis found to be sensitive to heat shock temperature compared to late embryonic stages. Coulon and Mathelin (1991) also opined that the initiation phase (from 72 hour to 120 hour) is more sensitive to stress than deep diapause phase. Interestingly, the increased hatching percentage (97.16% at 30° C) over control in CSR2 might be due to acquired thermotolerance by over expression of 30 kDa protein as reasonable metabolism of the 30 kDa protein is a prerequisite for the normal development of embryo (Zhong *et al.*, 2005).

On the other hand, although, heat shock temperature between 35 and 45° C on young embryos reduced the hatching ability but 45° C and above acts as lethal by inhibiting embryonic development to less than 50 percent (Table I). This high rate of varied embryonic death occurred in both the silkworm strains (CSR2 and CSR4) at 45° C heat shock temperature might be influenced by complete denaturation of 84, 49, 22 and 21 kDa proteins. Thus based on percent of hatching, over expression and inhibition of some protein synthesis, it is inferred that CSR2 is comparatively more tolerant than CSR4. Since CSR2 was found to have better tolerance to heat shock, we have proposed earlier (Zamod and Manjunatha, 2002) to use CSR2 as male parent in place of NB4D2 with native multivoltine to produce F₁ hybrids for production of cocoons of commercial interest. Interestingly, the F₁ hybrids of native multivoltine Pure Mysore as female parent and CSR2 as male parent proved to be the best F₁ hybrids at field level (Dandin *et al.*, 2004). Keeping in view the compatibility of CSR2 as male component and performance of Kolar Gold (PM × CSR2) as promising commercial breed (CB) as experienced by the farmers the present approach undoubtedly would keep both bivoltine and CB program in right perspective to improve cocoon yield and silk direction.

The other unique feature of the present study is that 62 kDa protein was found to be strain / race specific as it varies between CSR2 and CSR4 (Figs. 1B and C) and remain heat stable up to 45° C which offers further analysis.

With these findings, it is highly suggestive to determine the threshold level of thermotolerance and thermosensitive stage of different silkworm strains, since different organisms use different HSPs to respond to similar levels of stress. Furthermore, this protocol is currently employed in our laboratory to screen all the silkworm germplasm (both polyvoltine and bivoltine) in order to determine the threshold level of thermotolerance and rate of HSPs expression as it is an easier and quicker method than the conventional breeding strategies.

REFERENCES

- COULON-BUBLEX M. & MATHELIN J. (1981) Variations in the rates of synthesis of heat shock proteins, HSP70, between laying and neural in the diapausing embryo of the silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia* 31: 295-300.
- DANDIN S. B., MAL REDDY N., BASAVARAJ H. K., SURESH KUMAR N., KALPANA G. V. & JOGE P. G. (2004) Use of CSR breeds with pure Mysore for high productivity. *Indian Silk* 43: 8-10.
- GLOVER C.V.C. (1982) In Heat shock from bacteria to man (M. Schlesinger, M. Ahsburner & A. Tissieres ed.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 227-234.

- HAHN J. S., HU Z., THIELE D. J., & IYER V. R. (2004) Genome-Wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol. Cellular Bio.* 24 5249-5256.
- HIGHTOWER L. E. (1991) Heat shock stress protein, chaperones and proteotoxicity. *Cell* 66: 191-197.
- HOWE R. W. (1967) Temperature effects on embryonic development in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 12: 15-42.
- KAMPINGA H. H. (1993) Thermotolerance in mammalian cells: Protein denaturation and aggregation and stress proteins. *J. Cell Sci.* 104: 11-17.
- SUJATHA K., PADMAJA P. & PURUSHOTAM RAO A. (2001) The cocoon and post cocoon characters of silkworm, *Bombyx mori* exposed to different temperature during larval development. *J. Exp. Zool.* 4: 211-214.
- SURESH KUMAR N., YAMAMOTO T., BASAVARAJA H. K. & DATTA R. K. (2001) Studies on the effect of high temperature on F₁ hybrids between polyvoltine and bivoltine silkworm races of *Bombyx mori* L. *Int. J. Indust. Entomol.* 2: 123-127.
- WALSH D. A., KLEIN N. W., HIGHTOWER L. E. & EDWARDS M. J. (1987) Heat shock and thermotolerance during early rat embryo development. *Teratology* 36: 181-191.
- WEBER K. & OSBORN J. (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- ZAMOOD A. & MANJUNATHA H. B. (2002) Heat shock response and thermotolerance of silkworm embryo – race CSR₂ and CSR₄. M. Sc. Dissertation, Department of Sericulture, Karnatak University, Dharwad.
- ZHONG BO-XIONG, JIAN-KE LI, JIANG-RONG LIN, JIAN-SHE LIANG, SONG-KUN SU, HAI-SHENG XU, HAI-YAN YAN, PING-BO ZHANG & HIROSHI FUJII (2005) Possible effect of 30 K proteins in embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Bioche. Biophys. Sinica* 37(5): 355-361.

REPONSE AU CHOC THERMIQUE ET ANALYSE DES PROTEINES DE L'ŒUF CHEZ LES NOUVELLES SOUCHES BIVOLTINES DE *BOMBYX MORI*

H. B. MANJUNATHA*, A. ZAMOOD, B. C. VASUDHA & H. S. APARNA**

Department of Sericulture, Karnatak University, Dharwad 580 003, Inde.

Dans ce rapport, nous avons analysé la thermotolérance et les changements induits par les chocs thermiques dans le profil protéique embryonnaire des nouvelles souches bivoltines, CSR₂ et CSR₄. On soumet les différents stades de développement des embryons de vers à soie (œufs) au choc thermique à 30, 35, 40 et 45° C. On enregistre l'augmentation de l'éclosion (97,16 %) par rapport au témoin quand on expose les embryons à une température modérée de 30° C pendant une heure au stade de blastokinèse. Une température de choc thermique de 45° C et au-dessus s'avère mortelle alors que le pourcentage d'éclosion tombe à moins de 50 %. On remarque la sur-expression de la protéine 30 kDa (y compris des protéines 27, 28 et 29 kDa) chez les embryons de 3 jours avec un choc thermique de 30° C. Les stades de preblastokinèse et de blastokinèse semblent être thermo-sensibles et les derniers stades embryonnaires sont thermotolérants.

INTRODUCTION

Le ver à soie *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycis), un insecte poikilothermique, est très sensible aux attaques environnementales. Cela entraîne une mauvaise croissance de l'embryon, une mauvaise éclosion, des larves faibles et la production de cocons inférieurs et de soie de mauvaise qualité. En particulier, dans les pays tropicaux comme l'Inde où la température et l'humidité varient d'une saison à l'autre et d'une région à l'autre, les sériculteurs s'exposent à de grands risques dans l'élevage du ver à soie. Le succès et l'expansion de l'élevage du ver à soie sont dus à l'introduction d'hybrides F1 de vers à soie polyvoltins indigènes (parent femelle) et bivoltins exotiques (parent mâle). Même dans ces cas là, le rendement en cocons, en soie et la qualité du fil de soie demeurent inférieurs à ceux des hybrides de vers à soie tempérés. Ainsi, pour surmonter ces problèmes, on a mis au point quelques nouvelles souches / hybrides bivoltins en utilisant des souches de vers à soie bivoltins thermotolérants comme matériau ressource de lignage (Suresh Kumar et coll., 2001). Mais, aucun essai n'a été réalisé pour déterminer la réponse au choc thermique à n'importe quel stade de développement de ces nouveaux hybrides / souches bivoltines.

La réponse au choc thermique est un phénomène physiologique universel présent à la fois chez des procaryotes et des eukaryotes (Glover, 1982). Cela se manifeste par la synthèse d'un ensemble de nouvelles protéines, " Les Protéines de Choc thermique " ou l'augmentation des quantités de certaines protéines spécifiques préexistantes en réponse à l'exposition d'un organisme ou d'une cellule à un stress thermique ou d'une autre nature. Les protéines de choc thermique sont censées assurer la survie dans des conditions de stress en assurant un rôle de protection par rapport aux dégâts ou la réparation des dégâts grâce à leur action de chaperons moléculaires (Hightower, 1991). Les

* (Correspondance : E-mail : manjunathabh@yahoo.com)

** Department of Biochemistry

cellules qui ont été pré-exposées au stress thermique acquièrent une résistance transitoire contre l'effet mortel d'un stress thermique consécutif et un tel stress thermique est provoqué par l'amélioration de la résistance des protéines contre la dénaturation thermique et l'agglomération (Kampinga, 1993). Les approches récentes dans l'identification au niveau du génome des gènes cibles HSF (facteurs de choc thermique) apportent un nouvel aperçu sur le rôle des HSF dans la croissance, le développement, la maladie et le vieillissement et dans la reprogrammation métabolique complexe qui se produit dans toutes les cellules en réponse au stress (Hahn et coll., 2004).

De plus, des embryons de rat exposés à une température élevée (43° C pendant 7,5 minutes) développent des défauts crano-faciens sévères. A l'opposé, un choc thermique non-tératogène (42° C pendant 10 minutes) fait que les embryons acquièrent une thermotolérance. La thermotolérance acquise est efficace pour protéger les embryons d'un traitement à la chaleur consécutif plus sévère (Walsh et coll., 1987). Compte tenu de cela, on a entrepris une étude systématique avec des objectifs spécifiques, a) pour déterminer la sensibilité de l'embryon en développement au choc à la chaleur, b) le seuil de thermotolérance et c) la détermination de l'impact du choc thermique sur l'expression des protéines de choc thermique et sur la dégradation des autres protéines.

MATERIELS ET METHODES

On se procure les cocons des nouvelles souches bivoltines CSR₂ et CSR₄ auprès des marchés aux cocons de grainage du gouvernement, à Sirsi, dans le Karnataka en Inde et on les maintient dans les conditions recommandées jusqu'à l'émergence. On prépare des pontes saines en croisant entre eux les papillons CSR₂ et CSR₄. On soumet ces pontes à un traitement à l'acide froid (1,1 sp. gr. HCL ; 25° C pendant 45 minutes) 20 heures après la ponte non seulement pour rompre la diapause mais aussi pour éviter un pré choc thermique dans le cas du traitement à l'acide chaud

A la fin de la diapause, on incube les œufs dans des conditions environnementales jusqu'à l'éclosion. Pour le choc thermique, on sélectionne les œufs à des intervalles de 24 h jusqu'à l'éclosion. On place environ 100 œufs par lot séparément dans des tubes à essai en verre à paroi fine et on les soumet à un choc à la chaleur dans un bain-marie régulé à 30, 35, 40 et 45° C avec une humidité à 90 % pendant 1 heure. On procède à trois répétitions par lot. On répète chaque expérience trois fois. Après le choc thermique, on incube tous les œufs comme les témoins jusqu'à l'éclosion. On analyse les données expérimentales sur l'éclosion en employant un logiciel statistique SPSS – ANOVA.

Analyse SDS-PAGE des protéines des œufs :

On homogénéise les œufs dérivés de chaque lot traité à une température différente de choc thermique après 1 heure avec 30 µl de tampon Tris-HCl (pH 6,8). On soumet les protéines de l'œuf extraites à 24 h d'intervalle à une électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide (12 % ; Weber et Osborn, 1969). Chaque trajet est chargé avec une quantité égale de protéine d'œuf.

RESULTATS

Détermination de la sensibilité embryonnaire à la chaleur :

Le développement embryonnaire entre les souches bivoltines CSR₂ et CSR₄ reste le même à 25° C comme le montre le pourcentage d'éclosion de respectivement 95,66 et 95,55 %. De façon intéressante, le pourcentage d'éclosion augmente de façon marginale à 96,50 % et 97,16 % par rapport au témoin chez les embryons de CSR₂ traités respectivement à la chaleur le 3^{ème} et le 4^{ème} jour (stade de blastokinèse) à 30° C. Au même moment, CSR₄ enregistre un pourcentage d'éclosion de 96 % avec un traitement à la chaleur le 3^{ème} et le 5^{ème} jour. Le nombre de larves qui éclôt baisse à 35° C à la fois chez CSR₂ et CSR₄. Les données varient de manière significative à tous les stades par rapport au témoin, comme le montre l'ANOVA à p < 0,05. Le pourcentage d'éclosion diminue encore à 86,16

(1 jour) chez CSR2 et à 82,66 (4 jours) chez CSR4 à 40° C. De plus, il se produit une baisse brutale de l'éclosion à moins de 50 % à 45° C à tous les stades de CSR2 et de CSR4. Le pourcentage d'éclosion le plus faible est de 38,16 et 37,83 et le plus élevé est de 52,66 (8 jours) et de 48,83 (7 jours) chez respectivement les souches CSR2 et CSR4 à 45° C. Le pourcentage d'éclosion enregistré à tous les stades de l'embryon à 45° C est significativement différent sur le plan statistique de celui obtenu avec les autres températures selon l'ANOVA à $p < 0,05$ (Tableau I).

Profil protéinique :

Le profil protéinique dérivé du témoin et des embryons traités à la chaleur de CSR2 et CSR4 est présenté dans la Figure 1 (A-C). Un ensemble de 14 à 16 bandes protéiniques est présent à la fois chez les souches CSR2 et CSR4. Les quatre bandes principales imputables à la vitelline – H (Fig. 1A, bande a), à la protéine spécifique de l'œuf (Fig. 1 A, bande b), à la vitelline L (Fig. 1A, bande c) et aux protéines 30 kDa (Fig 1A, bande d) s'avèrent similaires à la fois chez CSR2 et CSR4. La bande protéinique 62 kDa est quantitativement différente en étant plus importante chez CSR2 que chez CSR4 (Figs. 1B et C). On remarque la surexpression de la protéine 30kDa chez l'embryon de 3 jours exposé à 30° C chez CSR2 (Fig. 1A).

Comparativement, on observe des changements majeurs chez les embryons de 4 jours de CSR2 et CSR4 exposés à des températures variées de choc thermique. De manière intéressante, on observe une inhibition complète et partielle des protéines 84, 49, 22 et 21 kDa respectivement chez les souches CSR4 et CSR2 respectivement à 45° C (Fig 1.B). Cependant, il n'y a pas de changements remarquables dans aucune des bandes protéiques dérivées d'embryons de 5 jours sauf la protéine 27kDa à 45° C chez la souche CSR4. La différence caractéristique pour la protéine 62kDa entre CSR2 et CSR4 reste distincte à toutes les températures de choc thermique (Figs 1B & C). De plus, on n'observe pas de changement dans les bandes protéiniques jusqu'à l'éclosion à n'importe quelle température de choc thermique.

DISCUSSION

Il est évident que le choc à la chaleur pendant une heure à des températures variées sur différents stades de développement de l'embryon (à des intervalles de 24 heures) donne des résultats significatifs sur le plan statistique selon l'ANOVA à $p < 0,05$. Cela est en accord avec l'opinion qui existe selon laquelle la température environnementale en particulier, joue un rôle significatif sur la croissance et la productivité du ver à soie (Sujatha et coll., 2001 ; Howe, 1967). Nous avons fait la corrélation ici entre le choc à la chaleur par rapport à l'expression de 30 kDa et l'inhibition de la synthèse des protéines, la thermotolérance et l'indice de développement embryonnaire (Di), qui prend en compte le pourcentage d'éclosion en fonction de la durée de développement. Il est évident que le choc à la chaleur pendant une heure à des températures comprises entre 35 et 45° C et au-dessus a un grand impact sur le développement embryonnaire et le profil protéinique de l'œuf chez les nouvelles souches bivoltines CSR2 et CSR4. Les premiers stades embryonnaires jusqu'à la fin de la blastokinèse s'avèrent sensibles à la température de choc thermique par comparaison aux derniers stades embryonnaires. Coulon et Mathelin (1991) ont aussi émis l'opinion que la phase initiale (de 72 heures à 120 heures) est plus sensible au stress que la phase de la diapause profonde. De manière intéressante, l'augmentation du pourcentage d'éclosion (97,16 % à 30° C) par rapport au témoin chez CSR2 pourrait être due à l'acquisition de la thermotolérance par la surexpression de la protéine 30kDa puisqu'un métabolisme raisonnable de la protéine 30kDa est une condition nécessaire pour le développement normal de l'embryon (Zhong et coll., 2005).

D'autre part, bien que la température de choc à la chaleur entre 35 et 45° C sur les jeunes embryons diminue la capacité d'éclosion, à partir de 45° C, elle est mortelle car elle inhibe le développement embryonnaire à plus de 50 pour-cent (Tableau I). Ce taux élevé de mort embryonnaire chez les deux souches de vers à soie (CSR2 et CSR4) à une température de choc à la chaleur de 45° C, pourrait être

influencé par une dénaturation complète des protéines 84, 49, 22 et 21 kDA. Ainsi, d'après le pourcentage d'éclosion, la surexpression et l'inhibition de la synthèse de certaines protéines, on en déduit que CSR₂ est comparativement plus tolérante que CSR₄. Puisqu'il s'avère que CSR₂ a une meilleure tolérance au choc à la chaleur, nous avons déjà proposé (Zamod et Manjunatha, 2002) d'utiliser CSR₂ comme parent mâle à la place de NB₄D₂ avec un polyvoltin indigène pour produire des hybrides F₁ pour la production de cocons d'intérêt commercial. De manière intéressante, les hybrides F₁ du polyvoltin indigène Pure Mysore comme parent femelle et de CSR₂ comme parent mâle s'avèrent être les meilleurs hybrides F₁ sur le terrain (Dandin et coll., 2004). Compte tenu de la compatibilité de CSR₂ comme composant mâle et de la performance de Kola Gold (PM × CSR₂) comme lignée commerciale (CB) prometteuse d'après les expériences des fermiers, cette approche permettra sans aucun doute à la fois au programme bivoltin et au programme CB de s'orienter dans la bonne direction pour améliorer le rendement en cocons et l'avenir de la soie.

L'autre caractéristique unique de cette étude est qu'il apparaît que la protéine 62 kDA s'avère être spécifique à la souche / race puisqu'elle varie entre CSR₂ et CSR₄ (Figs. 1B et C) et reste stable à la chaleur jusqu'à 45° C, ce qui offre des possibilités d'analyse supplémentaire.

Avec ces observations, on peut suggérer de déterminer le niveau plafond du stade de thermotolérance et de thermosensibilité des différentes souches de vers à soie, puisque différents organismes utilisent différentes HSPs pour répondre à des niveaux similaires de stress. De plus, on emploie couramment ce protocole dans notre laboratoire pour analyser tous les germoplasmes du ver à soie (à la fois polyvoltin et bivoltin) pour déterminer le niveau seuil de thermotolérance et le taux d'expression des HSPs puisque c'est une méthode plus facile et plus rapide que les stratégies conventionnelles de lignage.

EFFECT OF *NOSEMA BOMBYCIS* NAEGELI (NOSEMATIDAE) INFECTION ON THE SILK GLANDS OF SILKWORM *BOMBYX MORI* L. (BOMBYCIDAE) - AN ULTRASTRUCTURAL STUDY

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

Karnataka State Sericulture Research & Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560062, India.

Tel. No. Off. : 091-080-28435221-Ext. 241, Fax: 091-080-28435340,

Res. : 091-080-2 8435313 Email: jyothi_achaiiah@yahoo.com

The effect of infection by a microsporidium, Nosema bombycis on the ultrastructure of silk gland in silkworm, Bombyx mori was investigated. The parasite was found in developing stages with very few numbers of mature spores at 5 days post infection and the structural changes in the cell cytoplasmic organelles were not pronounced. A marked structural disorganization associated with reduced number of free ribosomes, mitochondria and endoplasmic reticulum were observed at 10 days post infection. The cytoplasm of infected cells was less electron dense compared to that of uninfected cells, however, the basement membrane remained intact. N. bombycis infection and associated changes in silk gland cell organelles and its effect on their functions in comparison with uninfected are discussed.

Keywords: *Bombyx mori*, silk gland, *Nosema bombycis*, infection effect, ultra structure.

INTRODUCTION

The silk of the domesticated silkworm, *Bombyx mori* L. is synthesized in the pair of silk glands, which are modified ectodermal salivary glands. Silk gland cells never divide after the period of late embryonic development but increase in size more than 50,000 times during the larval period, facilitating the synthesis of silk (Akai, 1976). Silk gland cells produce the highly fibrous proteins, fibroin and sericin and the organization of the cells facilitates rapid synthesis of these proteins.

The microsporidium, *Nosema bombycis* Naegeli is a serious intracellular parasite that causes a chronic disease, "Pebrine" in silkworm. It initially infects the midgut epithelial cells and then spreads to other organs including silk glands. Several studies have been carried out on the structure and function of silk glands of healthy worms (Toshiro *et al.*, 1968; Morimoto *et al.*, 1968; Akai, 1976, 1982, 1983, 1985). And we hypothesize that parasite *N. bombycis* grows and multiplies within these cells and they may have profound effect both on secretory function and on the cells involved. This study investigates the effect of *N. bombycis* infection on silk gland and the changes in the silk gland cells at the ultra structural level.

* Author for correspondence

MATERIAL AND METHODS

Preparation of inoculum:

Spores isolated from silkworms were purified according to Cantwell (1974). The spore numbers in suspension were adjusted to 1×10^8 spores/ml using a Neubauer haemocytometer and stored at 4° C for further use.

Infection of silkworm larvae:

Silkworms (NB4D2 bivoltine race) from disease free stocks maintained in the laboratory were infected per os by smearing spores on mulberry leaf on day one of II instar following moult. They were reared following the standard methods (Krishnaswamy, 1990). The selected larvae were sacrificed every 24 hours and disease development and symptoms were recorded.

Light and electron microscopy:

Silkworms at 5 days (III instar, 2nd day) and 10 days (IV instar, 3rd day) post infection (pi) were dissected. Silk glands were removed and placed in Ringers' solution and observed under light microscope (400 ×).

For transmission electron microscope studies, silk glands were fixed in Karnovsky's fixative for 2 hrs at 4° C (Karnovsky, 1965), washed in 0.1 M cacodylate buffer, post fixed in 2% osmium tetroxide for 1 hr. Tissues were dehydrated in an ascending alcohol series, embedded in Epon - Araldite and polymerized in the vacuum embedding oven at 60° C for 72 hrs. Semi-thin sections were cut and stained with aqueous solution of 2% crystal violet. Thin sections were mounted on formvar coated copper grids (200 mesh) and stained with uranyl acetate and lead citrate. Observations were made using Jeol 100-CX II transmission electron microscope at 80 kV. Ultra structural observations of uninfected silk gland from uninfected larvae and infected from infected larvae were performed on the anterior, middle and posterior parts of silk gland.

RESULTS

Silk glands of silkworm, *B. mori* are smooth tube like paired structures. Each gland is divided into 3 divisions, anterior (ASG), middle (MSG) and posterior silk gland (PSG). MSG is further divided into anterior middle silk gland (AMSG), middle (MMSG) and posterior (PMSG). The ASG merely acts as passage and has no secretory function. The 3 parts of the MSG secrete three different types of sericin which coats the fibroin synthesized by the posterior silk gland.

In the present study, ultrastructure of the cells of the three divisions (ASG, MSG, PSG) of uninfected silk gland of third and fourth instars showed all the sub-cellular organelles typical for silk gland tissue as described (Akai, 1983; Morimoto *et al.*, 1968; and Toshiro *et al.*, 1968). The cytoplasm of uninfected cells contained well-defined mitochondria, free ribosomes, and rough endoplasmic reticulum of lamellar (LER) and vesicular (VER) type (Figs. 1 and 2). The basal membrane is smooth and continuous. The nucleus is polymorphic and has large numbers of nucleoli, chromatin blocks and ribosome like particles enclosed within the nuclear envelope (Fig. 3). The endoplasmic reticulum are flattened and densely studded with ribosomes. The cytoplasmic matrix of normal cell contains free ribosomes in considerable numbers. A large number of mitochondria are present in the cytoplasm (Fig. 1). These are either elongated or round with dense granules in the matrix and the cristae are lamellar type (Fig. 2). The microtubules in the uninfected cells are uniformly distributed throughout the cytoplasm. Microfilaments are concentrated in the apical region of cells (Fig. 4). The apical end i.e., toward the glandular lumen varied in three divisions. ASG posses chitinous lining and are not secretory in function (Fig. 6). The sericin produced in the MSG is secreted into the lumen through the sericin layer (Fig. 7); in the PSG the fibroin granules are secreted into the lumen through the cuticular intima (Fig. 4).

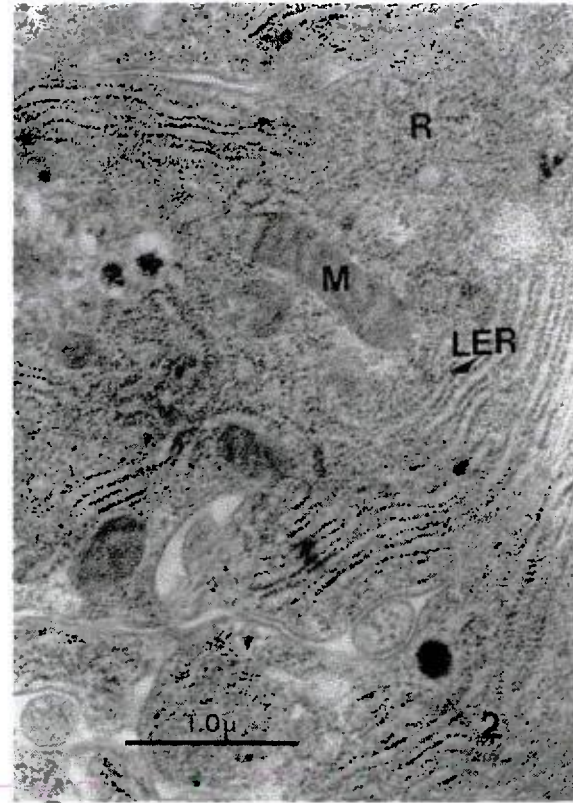
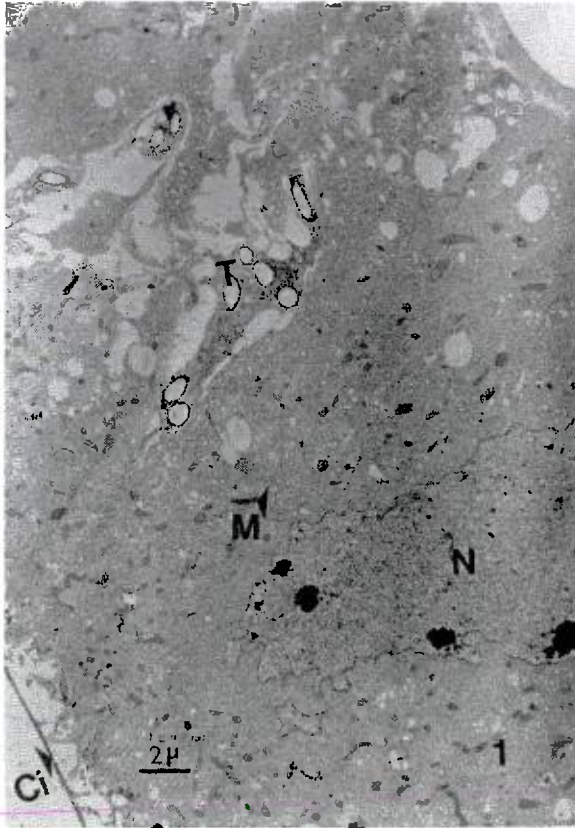


Fig.1. Low magnification electron micrograph of an uninfected PSG cells showing uniform distribution of mitochondria (M), cuticular intima (Ci), nucleus (N) and ramified trachea (T).

Fig. 1. Micrographie électronique à faible grossissement de cellules de la PSG non infestées présentant une distribution uniforme de mitochondries (M), d'intima cuticulaire (Ci), de noyau (N) et de trachée ramifiée (T).

Fig. 2. Silk gland cytoplasm with extensive lamellar rough endoplasmic reticulum (LER), ribosomes (R), mitochondria (M) in an uninfected cell of MSG.

Fig. 2. Cytoplasme de la glande séricigène avec un réticulum endoplasmique rugueux lamellaire extensif (LER); des ribosomes (R), des mitochondries (M) dans une cellule non infestée de la MSG.

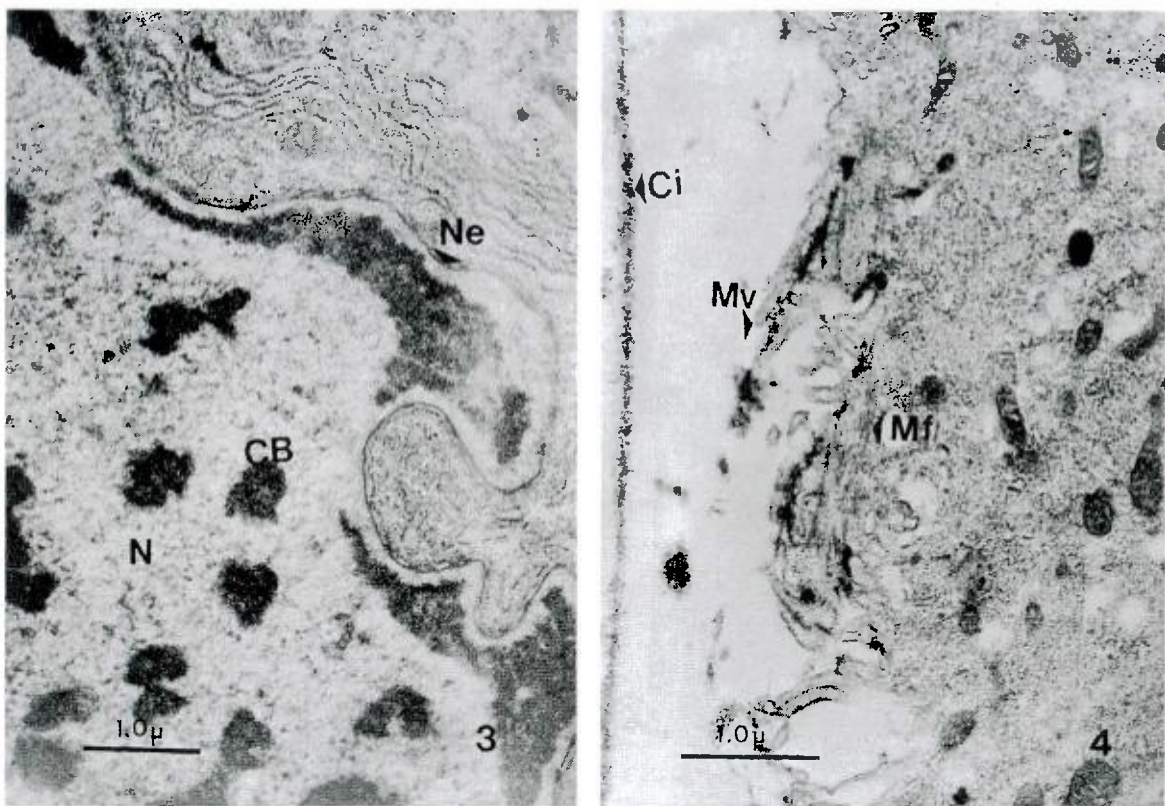


Fig. 3. Transverse Section (T. S.) through normal gland cell showing vesicular endoplasmic reticulum (VER), nuclear envelope (Ne) and chromatin blocks (CB) of the polymorphic nucleus.

Fig. 3. Coupe transversale (T. S.) de la cellule glandulaire normale présentant un reticulum endoplasmique vésiculaire (VER), une enveloppe nucléaire (Ne) et des blocs de chromatine (CB) du noyau polymorphe.

Fig. 4. T. S. through an uninfected gland cell showing continuous cuticular intima (Ci), microvilli (Mv) and microfilaments (Mf) in the apical region of the cell.

Fig. 4. Coupe transversale d'une cellule glandulaire non infestée présentant une intima cuticulaire (Ci), des microvilli (Mv) et des microfilaments (Mf) dans la zone apicale de la cellule.

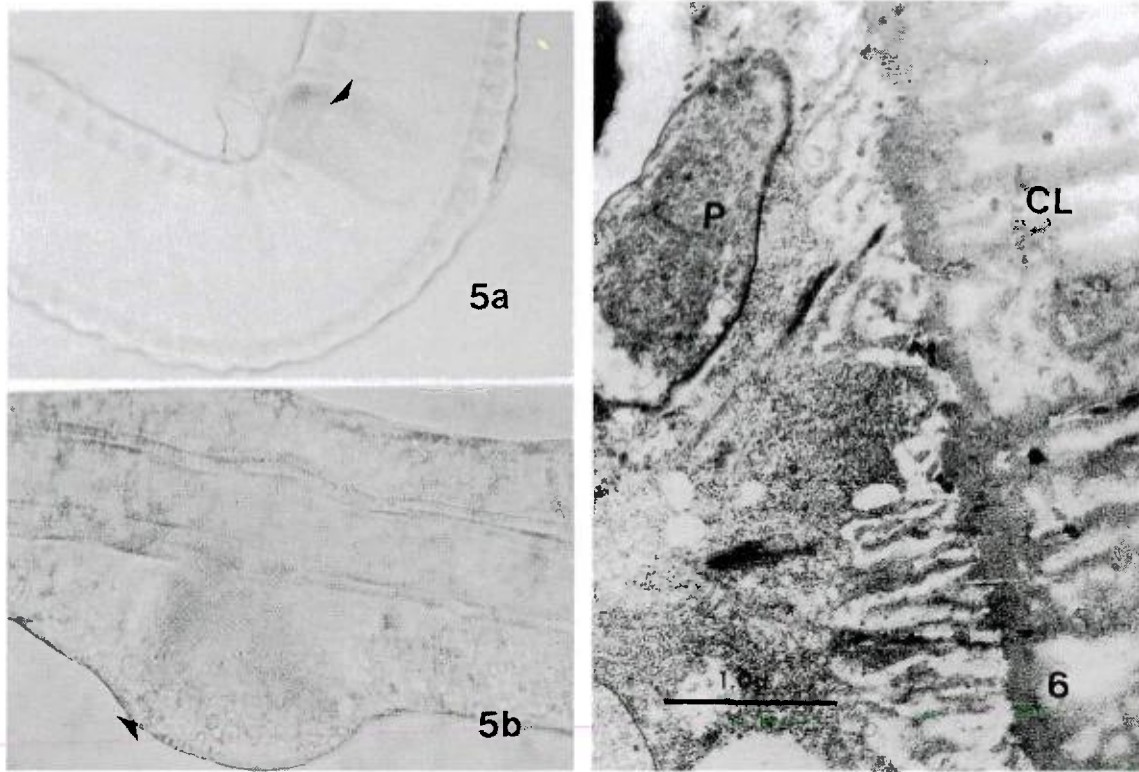


Fig. 5a. Photomicrograph of an infected MSG cell as observed *in toto* at 5 days post infection (pi). **Fig.5b** Photomicrograph of heavily infected ASG (arrow) indicates the region where white pustules are observed.

Fig. 5a. Photomicrographie d'une cellule infestée de la MSG observée *in toto* 5 jours après l'infestation (pi). **Fig. 5b.** Photomicrographie de l'ASG très infestée (flèche) indiquant la zone où on observe des pustules blancs.

Fig. 6 T.S. of ASG showing cuticular lining (CL) towards the lumen end of the gland cell. Parasite – P.

Fig. 6. Coupe transversale de l'ASG présentant une paroi cuticulaire (CL) vers l'extrémité de la lumière de la cellule de la glande. Parasite – P.

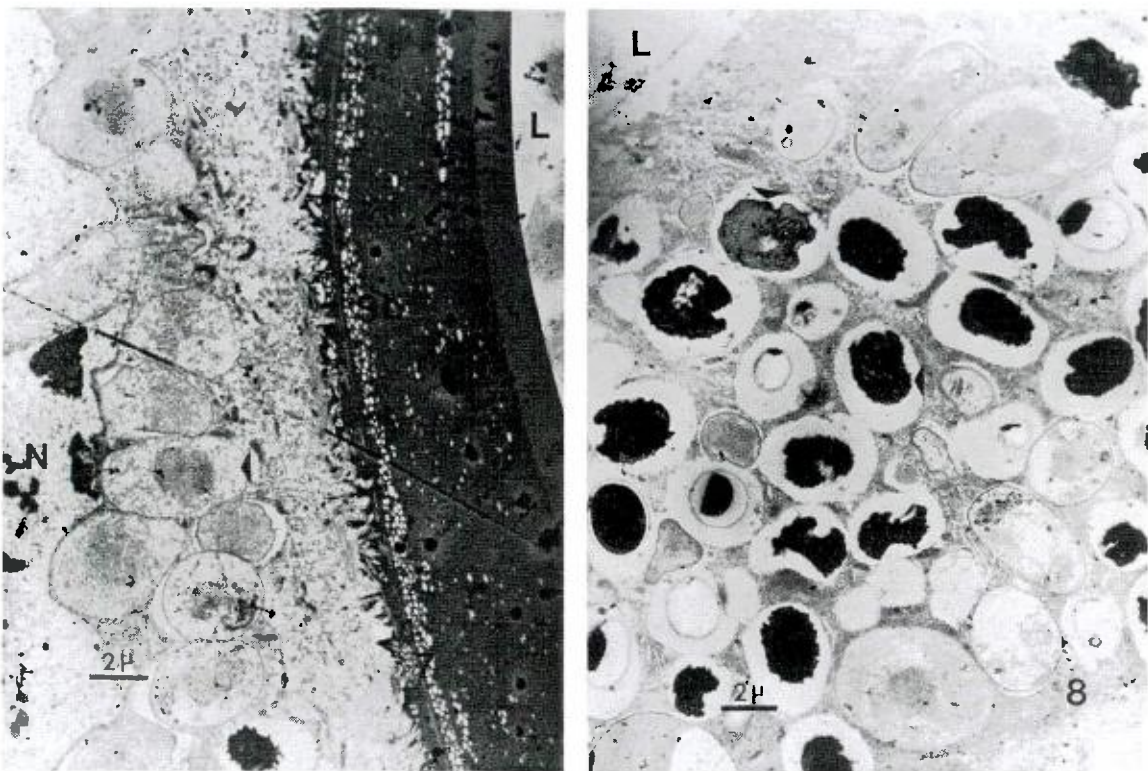


Fig. 7. T. S. of Middle silk gland at 5 days pi showing the sericin layer (SL), nucleus (N), lumen (L). Sporoblasts and spores in the early stage of differentiation are seen in the cytoplasm (arrow).

Fig. 7. Coupe transversale de la glande séricigène médiane 5 jours après l'infestation présentant la couche de séricine (SL), le noyau (N), la lumière (L). On peut voir les sporoblastes et les spores au début du stade de différenciation dans le cytoplasme (flèche).

Fig. 8 Posterior silk gland at 10 days pi. Cell is filled with spores and immature stages (arrows), lumen (L).

Fig. 8. Glande séricigène postérieure 10 jours après l'infestation. La cellule est remplie avec des spores et des stades immatures (flèches), lumière (L).

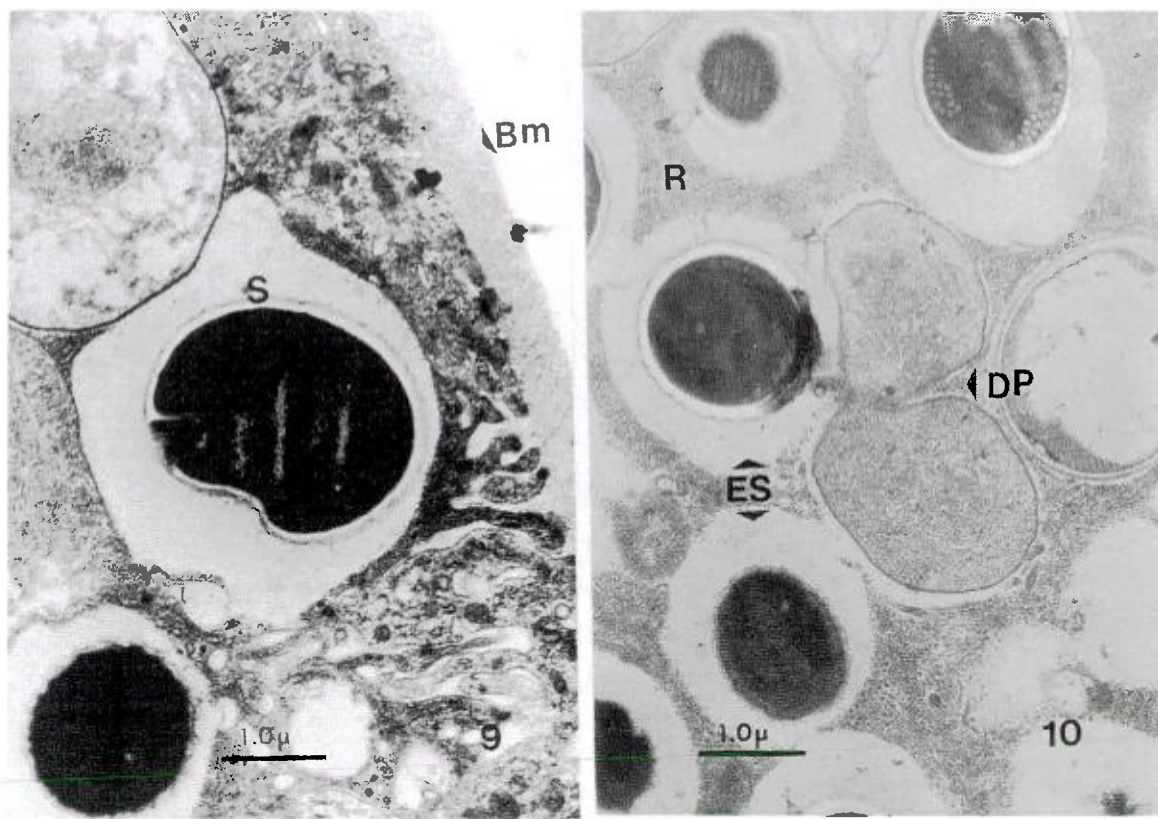


Fig. 9. Infected silk gland with spore towards the basal end. Bm- basal membrane, S- spores.

Fig. 9. Glande séricigène infestée présentant des spores vers la partie basale. Bm – membrane basale, S – spores.

Fig. 10. Enlarged portion of a heavily infected PSG. Empty space observed around the parasite (ES), parasite in its dividing stage (DP), ribosomes (R).

Fig. 10. Agrandissement de la PSG très infestée. Espace vide observé autour du parasite (ES), parasite à son stade de division (DP), ribosomes (R).

N. bombycis infects all three divisions of silk gland (Fig. 6-8). By viewing the entire silk gland with the use of low power magnification, it was possible to identify the infected cells by their opaque appearance and cell enlargement due to accumulation of spores (Figs. 5a and 5b). White pustules (swellings) appeared commonly on the silk glands (Fig. 5b). At 3 days post infection only 2-3 silk gland cells were found infected and it spread to 90% of the cells by 10 days pi.

There was no marked difference in the silk gland cell organelles of uninfected larvae and infected larvae at 5 days pi (Fig. 7). At 10 days pi, drastic changes in the structure of cellular components were observed (Fig. 8). The most striking observation is that the free ribosomes and LER are strongly reduced in the heavily infected cells. The elongated and large sized mitochondria of uninfected cells reduced in size as well as in number in the infected cells (Fig. 10).

In general, most of the silk gland cell organelles were displaced or pushed to the basal end of the host cells and the cytoplasmic space was occupied by the parasite (Fig. 9). The cytoplasm became electron transparent due to reduced number of ribosomes and due to the appearance of space around the spore in the cytoplasmic matrix (Fig. 10). The multiplying parasites in the cytoplasm of the invaded cell finally lead to the complete replacement of host cytoplasm. Cuticular intima, the inner lining of the lumen became discontinuous, while the basal membrane and the apical portion of the cell facing the lumen bearing numerous microvilli were not altered due to infection of *N. bombycis*.

DISCUSSION

The studies conducted on the development of *N. bombycis* in silkworms showed that the microsporidium infects all the tissues of silkworm and that effect is chronic. Examination of silk glands at 5 days pi showed few morphological changes, while the entire silk gland cells were filled with spores at 10 days pi and milky white pustules were observed on the silk glands. Wafa and Kotby (1971) considered the pustules to be evidence of cell hypertrophy. In the present study, the squash preparation of the pustules showed the presence of large number of spores. Ultra structural studies revealed that although the cytoplasmic organelles of lightly infected cells are relatively organized while a severe disorganization occurred in heavily infected cells.

The functional organelles of silk gland cells such as ER, ribosomes and mitochondria are strongly affected ones. High degree of scarcity of ribosomes was also observed by Jurand *et al.*, (1967) in *Sciaria ocellaris* infected with *Thelohania* sp. But the reduced mitochondrial number and size recorded in the present study is in contrast to the observations of Jurand *et al.* (1967). Transformation of remnants of mitochondria into large vacuoles after 10 days pi was recorded by Gansler and Rouiller (1956) and Wang and Moeller (1971) but was not observed in the present study. Fewer and smaller microvilli and collapse of intracellular ductules in honeybees infected with *N. apis* was observed by Wang and Moeller (1971), but no such changes are seen in the silk gland cells of silkworms. There was no change in the nuclear structure of infected cells. The parasites were observed only in the cytoplasm but not in the nucleus even in the heavily infected cells suggesting that the parasite multiplies only in the cytoplasm.

Iijima (1972) reported that fibroin proteins are not synthesized in the larval silk glands of naked pupa (pupa without cocoons) that contain distended ER, poorly developed Golgi complexes and the abnormal mitochondria with poor cristae. This suggests that a decrease in vital cell organelles such as RER, ribosomes and mitochondria would affect the protein synthesis. There are no changes in organelles of uninfected cells that are adjacent to infected ones and lightly infected silkworms could spin poor quality cocoons.

Another interesting observation is that in the heavily infected cytoplasm, large empty spaces were observed around the parasite without any cell organelles. It is presumed that, the parasite during its developing stages occupy enormous space and when the developing parasite transforms into mature spore there is a shrinkage and these spaces remain as such or the lysis of host cytoplasm is taking

place. The destruction of host cytoplasmic structures around the parasite has been recorded as lysis by a proteolytic enzyme (Petri, 1965).

The basal membrane and microvilli are not disrupted suggesting that *N. bombycis* derives nourishment from the host cells but does not kill the host cells immediately. The infected hosts survived for long durations in our other experiments. These observations indicate that effect of infection on the host silk gland cells is primarily mechanical disruption of infected cell organelles. The parasite does not invoke any inflammatory response in the cells. There is no sudden host cell death associated with the invasion and development of the parasite. This shows that the parasite lives in close association with the host during the early stages of its development and extensive destruction of host cell organelles takes place only in the later stages of the parasite development.

REFERENCES

- AKAI H. (1976) The silk gland. In, *Ultrastructural Morphology of Insects*. pp 57-114. University of Tokyo press. Tokyo (Japanese).
- AKAI H. (1982) The ultrastructure and functions of the silk gland cells of *Bombyx mori*. In, *Insect ultrastructure 2* (ed.R.C. King and H.Akai), pp.323-364, Plenum, New York.
- AKAI H. (1983) The structure and ultrastructure of the silk gland. *Experientia*, 39, pp. 443-449.
- AKAI H. (1985) Ultrastructure of the cuticular intima of the posterior silk gland in *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Japan*, 53, 72-76.
- CANTWELL G.E. (1974) Honey bee diseases' parasites and pests. In, *Insect Diseases* vol. II Ed. G.E. Cantwell, Newyork, Marcell Dekker, 501-547.
- GANSLER H. & ROUILLER C. (1956) Modifications Physiologique et Pathologique du. Chondriome. *Schweiz. Z. Allg. Pathol. Bakteriologie*, 19,217-243.
- IJIMA T. (1972) Ultrastructure of the posterior silk gland of the naked pupa silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 18, 2055-2063.
- JURAND A., SIMOES L.C.G. & PAVAN C. (1967) Changes in the ultrastructure of salivary gland cytoplasm in *Sciara ocellaris* (Comstock 1882) due to microsporidian infection. *J. Insect Physiol.*, 13, 795-803.
- KARNOVSKY M. J. (1965) A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J.Cell Biol.* 137A - 138A.
- KRISHNASWAMY S. (1990) New method of silkworm rearing, CSB. Pub. India.
- MORIMOTO T., MATSURA S., NAGATH S. & TASHIRO Y. (1968). Studies on the posterior silk gland of silkworm *Bombyx mori* III. Ultrastructural changes of posterior silk gland cells in the fourth larval instar. *J. Cell Biol.* 38, 604-614.
- PETRI M. (1965) A cytolytic parasite in the cells of transplantable, malignant tumours. *Nature (London)* 205: 302.
- TASHIRO Y., MORIMOTO T., MATSURA S & NAGATA S. (1968) Studies on the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. I. Growth of posterior silk gland cells and biosynthesis of fibroin during the fifth larval instar. *J. Cell Biol.*, 38,574 -588.
- WAFI & KOTBY (1971) Histopathological studies of *Nosema bombycis* Naegeli infecting the silkworm *Bombyx mori* (L). *Bull. Soc. Ent. Egypte* LV, 259 -274.
- WANG DER I. & MOELLER F.E. (1971) Ultra structural changes in the hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *J. Invertebr. Pathol.* 17, 308 -320.

L'EFFET DE L'INFESTATION PAR *NOSEMA BOMBYCIS* NAEGELI (NOSEMATIDAE) SUR LES GLANDES SERICIGENES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. (BOMBYCIDAE) - ETUDE ULTRASTRUCTURALE

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

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

Tel. No. Off. : 0091 –080- 284352 21 6 Poste 241, Fax : 091 –080-28435340,

Res. : 091 – 2843513, Email : jyothi_achaiiah@yahoo.com

Nous avons étudié l'effet de l'infestation par un microsporidien, Nosema bombycis sur l'ultrastructure de la glande séricigène chez le ver à soie, Bombyx mori. On trouve le parasite aux stades de développement avec très peu de spores mûres 5 jours après l'infestation et les changements structuraux dans les organites de la cellule cytoplasmique ne sont pas prononcés. On observe une désorganisation structurale marquée avec une diminution du nombre des ribosomes libres, des mitochondries et du reticulum endoplasmique 10 jours après l'infestation. Le cytoplasme des cellules infestées est moins dense aux électrons par comparaison à celui des cellules non infestées, cependant la membrane basale demeure intacte. Nous discutons de l'infestation par N. bombycis et des changements associés dans les organites de la cellule de la glande séricigène et de son effet sur leurs fonctions.

INTRODUCTION

La soie du ver à soie domestiqué, *Bombyx mori* L. est synthétisée dans la paire de glandes séricigènes qui sont des glandes salivaires ectodermes modifiées. Les cellules de la glande séricigène ne se divisent jamais après la période de développement embryonnaire tardif mais augmentent en taille plus de 50 000 fois pendant la période larvaire, ce qui facilite la synthèse de la soie (Akai, 1976). Les cellules de la glande séricigène produisent des protéines très fibreuses la fibroïne et la sérécine et l'organisation des cellules facilite la synthèse rapide de ces protéines.

Le microsporidien, *Nosema bombycis* Naegeli est un parasite intracellulaire sérieux qui provoque une maladie chronique, " la pébrine ", chez le ver à soie. Il infeste au départ les cellules épithéliales de l'intestin moyen puis se répand dans les autres organes dont les glandes séricigènes. Plusieurs études ont été réalisées sur la structure et la fonction des glandes séricigènes des vers sains (Toshiro et coll., 1968 ; Morimoto et coll., 1968 ; Akai, 1976, 1982, 1983, 1985). Nous avons émis l'hypothèse que le parasite *N. bombycis* croît et se multiplie à l'intérieur de ces cellules et cela pourrait avoir un effet profond à la fois sur la fonction sécrétrice et sur les cellules impliquées. Cette étude se penche sur l'effet de l'infestation par *N. bombycis* sur la glande séricigène et sur les changements dans les cellules de la glande séricigène au niveau ultrastructural.

* Auteur auquel adresser la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

Préparation de l'inoculum :

Nous avons purifié les spores isolées chez les vers à soie selon Cantwell (1974). On ajuste le nombre de spores en suspension à 1×10^8 spores / ml en utilisant un hémocytomètre Neubauer et on les stocke à 4° C pour une utilisation ultérieure.

Infestation des larves de vers à soie :

Les vers à soie (race bivoltine NB4D2) provenant de stocks sains maintenus au laboratoire sont infestés per os en enduisant de spores la feuille de mûrier le premier jour du deuxième âge après la mue. Ils sont élevés en suivant les méthodes classiques (Krishnaswamy, 1990). On sacrifie des larves sélectionnées toutes les 24 heures et on enregistre le développement de la maladie et les symptômes.

Microscopie optique et électronique :

On dissèque les vers à soie 5 jours (IIIème âge, 2^{ème} jour) et 10 jours (IVème âge, 3^{ème} jour) après l'infestation (pi). On retire les glandes séricigènes, on les place dans de la solution de Ringer et on les observe sous un microscope optique (400 ×).

Pour les études au microscope électronique à transmission, on fixe les glandes séricigènes dans du fixateur de Karnovsky pendant 2 heures à 4° C (Karnovsky, 1965), on les lave dans un tampon de cacodylate à 0,1 M, on les post fixe dans du tetroxide d'osmium à 2 % pendant 1 heure. On déshydrate les tissus dans une série d'alcool ascendante, on les inclut dans de l'Epon – Araldite et on les polymérise dans un four sous vide à 60° C pendant 72 heures. On effectue des coupes semi-fines et on les colore avec une solution aqueuse de violet de méthyle à 0,2 %. On monte les coupes fines sur des grilles de cuivre recouvertes de formvar (maille de 200) et on les colore avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb. On procède à des observations en utilisant un microscope électronique à transmission Jeol 100-CX II à 80 kV. On procède à des observations ultrastructurales de la glande séricigène non infestée provenant de larves non infestées et infestée provenant de larves infestées dans les parties antérieure, médiane et postérieure de la glande séricigène.

RESULTATS

Les glandes séricigènes du ver à soie *B. mori* sont des structures paires formant des tubes lisses. Chaque glande est divisée en trois parties, la glande séricigène antérieure (ASG), médiane (MSG) et postérieure (PSG). La MSG est à nouveau divisée en glande séricigène médiane antérieure (AMSG), médiane (MMSG) et postérieure (PMSG). L'ASG sert simplement de passage et n'a pas de fonction sécrétrice. Les 3 parties de la MSG sécrètent trois types différents de sérécine qui recouvrent la fibroïne synthétisée par la glande séricigène postérieure.

Dans cette étude, les cellules des trois divisions (ASG, MSG, PSG) de la glande séricigène non infestée du troisième et quatrième âge présentent toutes les organites cellulaires typiques du tissu de la glande séricigène d'après les précédentes descriptions (Akai, 1983 ; Morimoto et coll., 1968 et Toshiro et coll., 1968). Le cytoplasme des cellules non infestées contient des mitochondries bien définies, des ribosomes libres et un reticulum endoplasmique rugueux lamellaire (LER) et vésiculaire (VER) (Figs. 1 et 2). La membrane basale est lisse et continue. Le noyau est polymorphique et a un grand nombre de nucléoles, de blocs de chromatine et de particules de type ribosomes enfermés dans l'enveloppe nucléaire (Fig. 3). Le reticulum endoplasmique est aplati et densément parsemé de ribosomes. La matrice cytoplasmique de la cellule normale contient des ribosomes libres en grand nombre. Un grand nombre de mitochondries sont présentes dans le cytoplasme (Fig. 1). Elles sont allongées ou rondes avec des granules denses dans la matrice et les crêtes sont de type lamellaire (Fig. 2). Les microtubules dans les cellules non infestées sont distribuées de manière uniforme dans tout le cytoplasme. Les microfilaments sont concentrés dans la zone apicale des cellules (Fig. 4).

L'extrémité apicale, vers la lumière glandulaire se divise en trois parties. L'ASG possède une paroi chitineuse et n'a pas de fonction sécrétrice (Fig. 6). La sérine produite dans la MSG est sécrétée dans la lumière au travers de la couche de sérine (Fig. 7) ; dans la PSG les granules de fibroïne sont sécrétés dans la lumière par les intima cuticulaires (Fig. 4).

N. bombycis infeste les trois divisions de la glande sérigène (Figs. 6-8). En observant la glande sérigène entière à grossissement faible, il est possible d'identifier les cellules infestées d'après leur apparence opaque et à cause de l'agrandissement de la cellule due à l'accumulation des spores (Figs. 5a et 5b). Des pustules blanches (gonflements) apparaissent couramment sur les glandes sérigènes (Fig. 5b). Trois jours après l'infestation, on trouve seulement 2 à 3 cellules infestées puis cela se propage à 90 % des cellules 10 jours après l'infestation.

Il n'y a pas de différence marquée dans les organites de la cellule de la glande sérigène des larves non infestées et infestées cinq jours après l'infestation (Fig. 7). Dix jours après l'infestation, il se produit des changements radicaux dans la structure des composants cellulaires (Fig. 8). L'observation la plus frappante est que les ribosomes libres et le LER diminuent considérablement dans les cellules très infestées. Les mitochondries allongées et de grande taille des cellules non infestées diminuent en taille et en nombre dans les cellules infestées (Fig. 10).

En général, la plupart des organites de la cellule de la glande sérigène sont déplacés ou poussés vers l'extrémité à la base des cellules de l'hôte et l'espace cytoplasmique est occupé par le parasite (Fig. 9). Le cytoplasme devient transparent aux électrons en raison de la diminution du nombre de ribosomes et en raison de l'apparition d'un espace autour de la spore dans la matrice cytoplasmique (Fig. 10). La multiplication des parasites dans le cytoplasme de la cellule envahie entraîne finalement le remplacement complet du cytoplasme de l'hôte. Les intima cuticulaires, la paroi interne de la lumière deviennent discontinus tandis que la membrane basale et la partie apicale de la cellule faisant face à la lumière portant de nombreuses microvillosités ne sont pas altérées par l'infestation.

DISCUSSION

Les études réalisées sur le développement de *N. bombycis* chez les vers à soie montrent que le microsporidien infeste tous les tissus du ver à soie et que l'effet est chronique. L'examen des glandes sérigènes 5 jours après l'infestation montre peu de changements morphologiques, tandis que toutes les cellules de la glande sérigène sont remplies avec des spores 10 jours après l'infestation et on observe des pustules blanc crèmeux dans les glandes sérigènes. Wafa et Kotby (1971) considèrent les pustules comme la preuve de l'hypertrophie de la cellule. Dans cette étude, la préparation écrasée des pustules montre la présence d'un grand nombre de spores. Les études ultrastructurales révèlent que les organites cytoplasmiques des cellules légèrement infestées sont relativement organisés tandis qu'une désorganisation sévère se produit dans les cellules fortement infestées.

Les organites fonctionnelles des cellules de la glande sérigène telles que l'ER, les ribosomes et les mitochondries sont fortement affectés. Jurand et coll., (1967) ont aussi observé un degré élevé de rareté des ribosomes chez *Sciaria ocellaris* infesté par *Thelohania* sp. Mais la diminution du nombre de mitochondries et de leur taille enregistrée dans cette étude est en contraste avec les observations de Jurand et coll., (1967). La transformation des restes des mitochondries en grandes vacuoles dix jours après l'infestation a été enregistrée par Gansler et Rouiller (1956) et Wang et Moeller (1971) mais n'a pas été observée dans cette étude. Wang et Moeller ont observé moins et de plus petites microvillosités et effondrements des ductules intracellulaires chez les abeilles infestées par *N. apis*, mais il ne se produit pas de tels changements dans les cellules de la glande sérigène des vers à soie. Il n'y a pas de changement dans la structure nucléaire des cellules infestées. On observe les parasites seulement dans le cytoplasme mais pas dans le noyau même dans les cellules très infestées, ce qui suggère que le parasite se multiplie seulement dans le cytoplasme.

Iijima (1972) a rapporté que la fibroïne n'est pas synthétisée dans les glandes sérigènes de la larve de la nymphe nue (nymphe sans cocon) qui contient un ER détendu, un appareil de Golgi peu

développé et des mitochondries anormales avec peu de crêtes. Cela suggère qu'une diminution des organites vitaux de la cellule telles que le RER, les ribosomes, et les mitochondries aurait un effet sur la synthèse des protéines. Il n'y a pas de changement dans les organites des cellules non infestées qui sont proches des cellules infestées et les vers à soie peu infestés peuvent filer des cocons de mauvaise qualité.

Une autre observation intéressante est que dans le cytoplasme fortement infesté, on observe de grands espaces vides autour du parasite sans organite. On présume que le parasite pendant ses stades de développement occupe un espace énorme et quand le parasite en développement se transforme en spore mûre, il se produit un rétrécissement et ces espaces restent tels quels ou bien il se produit une lyse du cytoplasme hôte. On a enregistré la destruction des structures cytoplasmiques de l'hôte autour du parasite due à une lyse par une enzyme protéolytique (Petri, 1965).

La membrane basale et les microvillosités ne sont pas modifiées, ce qui suggère que *N. bombycis* se nourrit sur les cellules hôtes mais ne tue pas les cellules hôtes immédiatement. Les hôtes infestés survivent pendant de longues durées dans nos expériences. Ces observations indiquent que l'effet de l'infestation sur les cellules de la glande séricigène de l'hôte est principalement un dérangement mécanique des organites de la cellule infestée. Le parasite n'entraîne pas de réponse inflammatoire dans les cellules. Il n'y a pas de mort soudaine de la cellule hôte associée à l'invasion et au développement du parasite. Cela montre que le parasite vit en proche association avec l'hôte pendant les premiers stades de son développement et il ne se produit une destruction massive des organites de la cellule hôte que pendant les derniers stades de développement du parasite.

A UNIQUE SHEATHED SENSILLA ON THE ABDOMINAL SURFACE OF THE MUGA SILKWORM, *ANTHERAEA ASSAMENSIS* (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE)

SURENDRA SINGH¹, SUDIP DEY^{*1}, D. K. SHARMA², A. RAGHUVARMAN³ & R. CHAUDHURY⁴

1. Regional Sophisticated Instrumentation Centre, North Eastern Hill University, Shillong-793003, India.

2. Department of Zoology, Gauhati University, Guwahati 14, India.

3. Department of Zoology, North-Eastern Hill University, Shillong – 793 0022, India.

4. Central Silkboard Extension Centre, Nongpoh, India.

Scanning electron microscopic studies revealed the presence of a unique sensilla on the fourth and fifth abdominal segment of the third instar muga silkworm. The morphological feature of the sensilla were found to be unique in the sense that, it had no absolute resemblance with any of the insect sensilla described so far. Due to its morphological peculiarities, the sensilla cannot be placed with any of the insect sensilla i. e. sensilla trichodea, sensilla basiconica, sensilla chaetica etc. described so far. The possible functional significance of the sensilla in the muga silkworm is described with the help of the available literature.

Keywords: *Antheraea assamensis*, sensilla, abdominal surface, chemoreception, olfaction, mechanoreception.

INTRODUCTION

Antheraea assamensis (muga silkworm) is a semi domesticated, multivoltine and polyphagous insect, having six broods in a year (Seitz, 1933). The silkworm is endemic to Assam and other adjoining north-eastern states of India. Out of the six broods of muga silkworm, only two are popular for commercial rearings (Yadav and Goswami, 1999), which are conducted during May-June and October-November because of the favourable climatic conditions. It has been reported that the muga silkworm has certain characteristic pattern in their general behaviour in response to the unique climatic condition of the region of its occurrence (Choudhury, 1981). Hence, it was not possible to rear them outside North-East India. Further, attempts of indoor rearing of the worm, (Thangavelu and Sahu, 1986) were not very encouraging at commercial level due to certain associated problems.

In this context, it is to be noted that the adaptational diversity of an insect is best expressed by the chemical as well as structural specialisation of the chitinous cuticle, covering the body (Neville, 1975), which has variations among different species and also in different body parts.

Sensilla or specialized cuticular structures are reported to occur in different body parts of insects and are known to perform a variety of functions (Bland, 1983 ; George and Nagy, 1984 ; Alm and Hall, 1986 ; Crouau and Croua-Roy, 1991 ; Dey *et al.*, 1999; Choudhury *et al.*, 2001). Although extensive studies have been carried out on sensilla of a number of lepidopterans (Adults and larvae),

* Address for correspondence.

very few reports on the same in the muga silkworm, *Antheraea assamensis* are available in the existing literature (Dey *et al.*, 1997 ; Hazarika and Bordoloi, 1998 ; Dey, 1999 ; Dey *et al.*, 2002). It is to be noted in this context that the morphology, behaviour and ecophysiology of the muga silkworm, *Antheraea assamensis* are known to be different from those of other related species (Choudhury, 1981).

It appears that the first step in understanding the complexity of behaviour of an insect is through examination of its sensory structures. The present study was therefore aimed at a search for peculiarities in sensory structures that might relate to the characteristic ecophysiology and behaviour of the muga silkworm.

MATERIALS AND METHODS

The commonest morphotype i.e. the green morphotype of the third instar larva was used in the study. Live specimens were brought from State Muga Farm, Govt. of Assam to the Electron Microscope Laboratory. The worms were sacrificed by exposing them to Benzene vapour. The abdominal segments were excised into small pieces and were fixed in 2.5% glutaraldehyde prepared in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 4h at 4° C. The samples were washed with the buffer, dehydrated through increasing concentration of acetone and critical point dried in a Samdri PVT 3 (Tousimis) critical point dryer using acetone as intermediate fluid and carbon dioxide as transitional fluid. The dry samples were secured horizontally to the specimen brass stub (10 mm diameter × 30 mm high) using double-coated adhesive tape, connected via a patch of silver paint to ensure charge conduction. Care was taken to avoid any trapped air bubble. A thin conductive coating of gold was applied to the sample using a JFC 1100 (Jeol) ion sputter, at a relatively low vacuum of 10^{-3} torr in the sputtering chamber. The coated samples were examined in a JSM-35CF (Jeol) Scanning electron microscope operated at 15 KV. The tilt control was fixed at 0 degree for setting the specimen stage in a horizontal position, the working distance (WD) selector was used to set the WD to 15 mm. Altogether 15 individual larvae were used in the present study. A comparison was made on length, breadth, structural features of the socket, surface ultra-structure etc between the sensilla detected in abdominal segment of muga silkworm and those of other insects described by different authors.

RESULTS AND DISCUSSION

The fourth and fifth abdominal segment of the third instar larva exhibited about 4 to 5 numbers of some unique sensilla with some characteristic morphological features, not reported in any insect sensilla so far. The total length of the sensilla was found to be around 275 μm . The socket was well developed, round and with a diameter of about 22 μm (Fig. 1, 2). At a distance of about 107 μm from the base, the sensilla exhibited a sheath-like structure connecting the proximal and distal parts. Just near the sheath, the sensilla was found to be thinner in width (5 μm) proximally as compared to the distal part (12.5 μm) (Fig. 1). From that part again, the sensilla towards the tip showed broader width (15 μm) up to around 50 μm distance leading to a narrow tip (7 μm in width) (Fig. 1). The surface of the major portion of the sensilla showed some undulations and foldings indicative of large surface area for reception of sensory stimuli (Fig. 4). Innumerable minute pores present throughout suggested the multi porous nature of the sensilla (Figs 1, 2, 3). The entire distal portion of the sheath showed cylindrical nature, whereas the proximal portion including the tip appeared to be flat (Figs 1, 5, 6). Peculiarities of the sheathed sensilla in comparison to other types of sensilla were well recognized.

Comparison with sensilla trichodea:

Length and breadth:

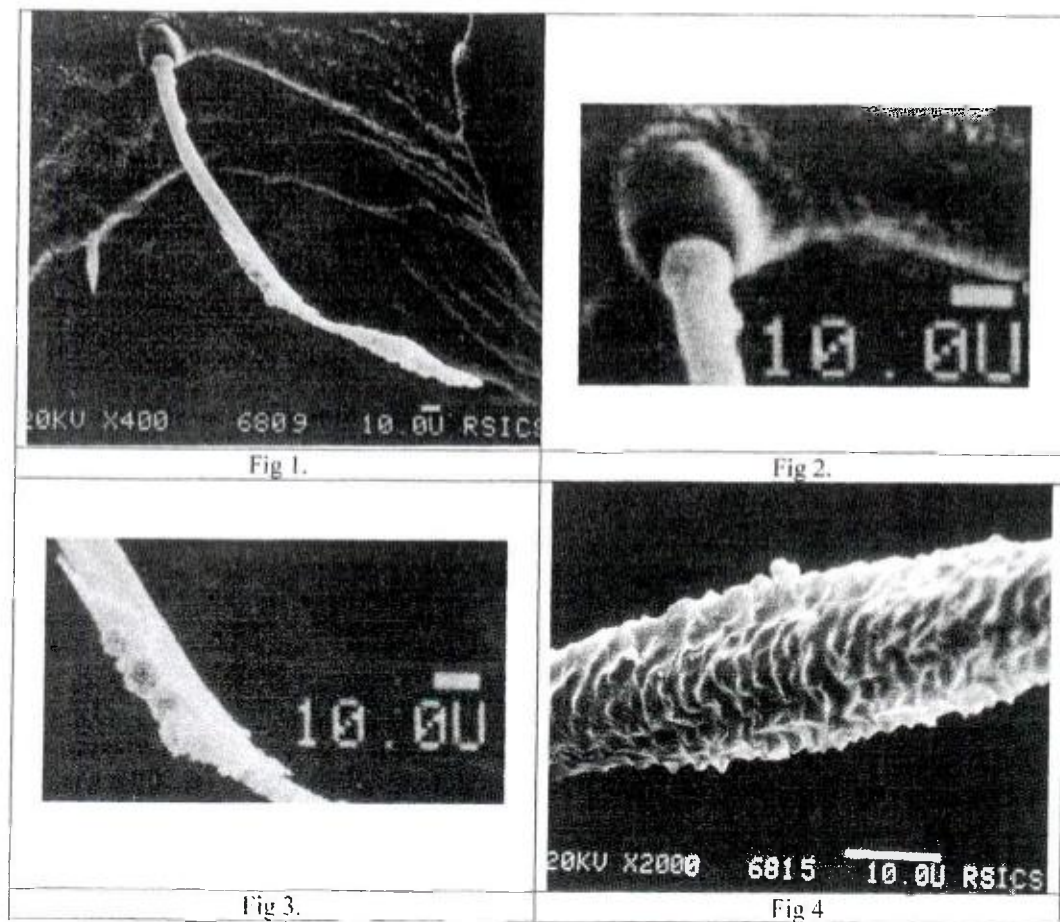


Fig. 1. Scanning Electron Micrograph (SEM) of sheathed sensilla (bar = 10 μ).

Fig. 1. Micrographie électronique à balayage (SEM) d'une sensille gainée (barre = 10 μ).

Fig. 2. Enlarged view of socket of sheathed sensilla (SEM) (bar = 10 μ).

Fig. 2. Agrandissement d'une cavité d'une sensille gainée (SEM) (barre = 10 μ).

Fig. 3. Scanning Electron Micrograph of a portion of sheathed sensilla showing the presence of pores on the surface (bar = 10 μ).

Fig. 3. Micrographie électronique à balayage (SEM) d'une partie de sensille gainée montrant la présence de pores à la surface (barre = 10 μ).

Fig. 4. Enlarged view (SEM) of the surface of a portion of sheathed sensilla showing undulations and folding. (bar = 10 μ).

Fig. 4. Agrandissement de la surface d'une partie de sensille gainée montrant les ondulations et les plis (barre = 10 μ).

Table I. Comparisons of morphological features, number and distribution pattern of sheathed sensilla with those of sensilla trichodea of different insect species.

Tableau I. Comparaison des caractéristiques morphologiques, du nombre et du schéma de distribution des sensilles gainées avec celles des sensilla trichodea chez différentes espèces d'insectes.

Sl. No.	Name of the sensilla	Name of the insect possessing the sensilla	Location	Length (μ) Average	Width (μ) (average)		Number		Surface ultra-structural features	Possible function	References
No. de Série	Nom de la sensille	Nom de l'insecte possédant la sensille	Localisation	Longueur (moyenne) (μ)	Base	Tip	Average Range		Caractéristiques ultrastructurales de la surface	Fonction possible	
					Base	Extrémité	Moy.	Fourchette			
1	Sheathed sensilla	<i>Antheraea assamensis</i>	Abdominal segment	275	10	7	4.5	4-5	Absence of striation, presence of irregular sculpturing	Chemo-reception olfaction, mechano-reception	Present work
	<i>Sensilles gainées</i>		<i>Segment abdominal</i>						<i>Absence de striation, présence de sculptures irrégulières</i>	<i>Chimioréception, mécano-réception olfaction.</i>	<i>Etude actuelle</i>
2	Sensilla trichodea (long / longues)	<i>Heliothis virescens</i>	<i>Tarsomere-V</i>	75	4.6	0.9	4	2-6	Herring bone striations <i>Striations en chevrons</i>	Contact chemo-reception <i>Chimioréception de contact</i>	Baker & Ramaswamy (1990)
3	Sensilla trichodea (short / courtes)	<i>Heliothis virescens</i>	Contact region of each tarsus <i>Zone de contact de chaque tarse</i>	44	8	1	38	20-56	Irregular longitudinal striations <i>Striations longitudinales irrégulières</i>	Contact chemo-reception <i>Chimio-réception de contact</i>	Baker & Ramaswamy (1990)
4	Sensilla trichodea type-Ib	<i>Pseudaletia unipunctata</i>	Antennal flagellum <i>Flagelle antennaire</i>	44.9	3.1	1.3	280	200-360	Herring bone striations <i>Striations en chevrons</i>	Contact chemo-reception <i>Chimio-réception de contact</i>	Baker & Ramaswamy (1990)

Table I. (continued ...).

Tableau I. (Suite...).

Sl. No.	Name of the sensilla	Name of the insect possessing the sensilla	Location	Length (μ) Average	Width (μ) (average)		Number		Surface ultra-structural features	Possible function	References
No. de Série	Nom de la sensille	Nom de l'insecte possédant la sensille	Localisation	Longueur (moyenne) (μ)	Base	Tip	Average Range		Caractéristiques ultrastructurales de la surface	Fonction possible	
							Nombre				
							Base	Extrémité			
5	Sensilla trichodea	<i>Homeosoma nebulella</i>	Antennal flagellum <i>Flagelle antennaire</i>	27	8	1	8272	8063-8549	Presence of regularly space annular ridges multi-porous nature <i>Présence d'arêtes annulaires espacées régulièrement</i>	Contact chemo-reception <i>Chimio-réception de contact</i>	Baker & Ramaswamy (1990)
6	<i>Sensilla trichodea</i> type-I	<i>Graphium sarpedon</i>	Tarsus <i>Tarse</i>	48	6.2	2.5	2	1-3	Smooth non-porous <i>Lisse, non poreuse</i>	Mechano-reception <i>Mécano-réception</i>	Dey <i>et al.</i> , (1995)
7	<i>Sensilla trichodea</i> type-II	<i>Graphium sarpedon</i>	Coxa	50	17	-1.2	36	32-34	Longitudinal striation, porous <i>Striation longitudinale, poreuse</i>	Contact chemo-reception <i>Chimio-réception de contact</i>	Dey <i>et al.</i> , (1995)
8	<i>Sensilla trichodea</i> type-II	<i>Antheraea assamensis</i>	Ventral surface of head thorax, abdomen <i>Surface ventrale de la tête, thorax, abdomen</i>	520	10	4	210	150-270	Longitudinal striations <i>Striations longitudinales</i>	Contact chemo-reception <i>Chimio-réception de contact</i>	Dey (1999)

Table I shows the comparative data on length and bread of the sheathed sensilla detected in the present study as compared to those of Sensilla trichodea (Fig. 7) described in various insects by different authors.

The maximum length of Sensilla trichodea described in other insect was found to be less than that of the Sheathed sensilla reported in the present work. However, some sensilla trichodea in the abdominal segment of muga silkworm was found to be of higher length (Dey, 1999) as compared to the general length of common *Sensilla trichodea*.

The width of the sensilla detected in the present study was also found to be larger than that of the sensilla trichodea described in other insect. The width of sensilla trichodea in most of the insects was found to range from 3-10 μ m at the base and from 0.9 to 4 μ m at the tip. In contrast, the width of the sheathed sensilla detected in the present study was about 10 μ m at the base and 7 μ m at the tip.

Number:

The number of the sheathed sensilla detected in the present work was found to be around 4-5 each on the fourth and fifth abdominal segments. In contrast, sensilla trichodea in other insects were described in various locations of the body and their number was found to be much higher (Table I).

Surface ultra-structure:

Fig. 1 shows the surface ultra-structural features of a typical sensilla trichodea from the fifth instar larva of the muga moth in different locations of the body. The sensilla trichodea is characterised by the presence of longitudinal striations, which were not present on the sheathed sensilla investigated in the present study. The comparative data on surface ultra structure features of the sheathed sensilla and different types of sensilla trichodea described in various insects by other workers are presented in Table I.

Comparison with sensilla chaetica:

Length and breadth:

A comparison of the length and breadth of sheathed sensilla with those of sensilla chaetica (Fig 8) is shown in Table II. It was observed that sheathed sensilla was longer than most of the sensilla chaetica described in other insects, except that of the butterfly, *Graphium sarpedon* detected in coxal and trochanteral edge and the fifth instar larva of *Antheraea assamensis* in head, thoracic and abdominal cuticle. Breadth of the sensilla chaetica (base and tip) described in other insects was also found to be less than the sheathed sensilla except that of muga silkworm larva reported by us elsewhere.

Number:

The number of sensilla chaetica is in general higher than that of the sheathed sensilla detected in the present study.

Surface ultra structural feature:

The surface ultra-structural features of sensilla chaetica are known to be characterised by the presence of a longitudinally grooved surface with circular striations, (Fig. 8) which were absent on the surface of the sheathed sensilla (Fig. 1).

Comparison with sensilla basiconica:

Length and breadth:

Basiconic sensilla in general are much shorter than sensilla chaetica and sensilla trichodea. Their breadth at the base and tip is also much smaller. Hence, the length and breadth of sheathed sensilla detected in the present study, which is longer and wider than sensilla trichodea and sensilla chaetica is obviously much greater in dimension than the sensilla basiconica (Table III).

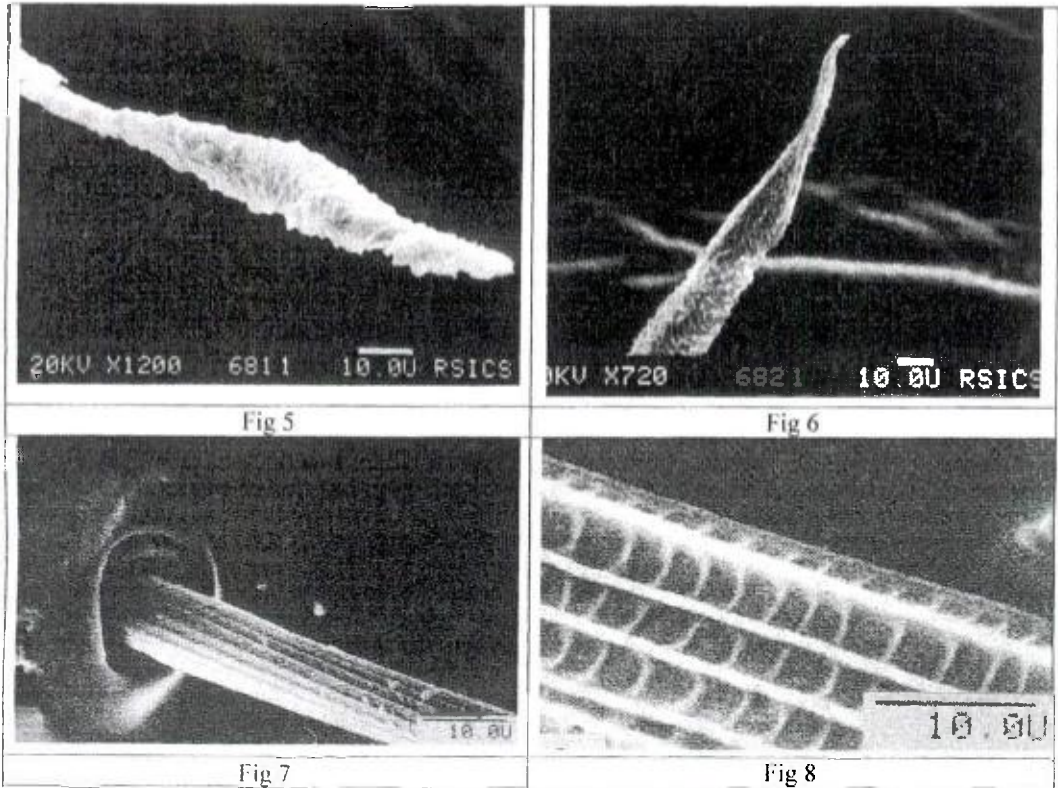


Fig. 5. Scanning Electron Micrograph of sheathed sensilla showing cylindrical nature of the distal part and flat nature of the proximal part. (bar = 10 μ).

Fig. 5. Micrographie électronique à balayage d'une sensille gainée montrant la nature cylindrique de la partie distale et la nature plate de la partie proximale. (barre = 10 μ).

Fig. 6. Enlarged view of the tip of the sensilla showing its flat nature (bar = 10 μ).

Fig. 6. Agrandissement de l'extrémité de la sensille montrant sa nature plate (barre = 10 μ).

Fig. 7. Scanning Electron Micrograph of a typical sensilla trichodea from *Antheraea assama* (bar = 10 μ).

*Fig. 7. Micrographie électronique à balayage d'une sensilla trichodea typique d'*Antheraea assama* (barre = 10 μ).*

Fig. 8. Scanning Electron Micrograph of a typical sensilla chaetica from *Antheraea assama* (bar = 10 μ).

*Fig. 8. Micrographie électronique à balayage d'une sensille chaetica d'*Antheraea assama* (barre = 10 μ).*

Table II. Comparison of morphological features, number and distribution pattern of the sheathed sensilla with those of sensilla chaetica of different insect species.

Tableau II. Comparaison des caractéristiques morphologiques, du nombre et du schéma de distribution des sensilles gainées avec celles de sensilla chaetica chez différentes espèces d'insectes.

Sl. No.	Name of the sensilla	Name of the insect possessing the sensilla	Location	Length (μ) (average)		Width (μ) (average)		Number		Surface ultra-structural features	Possible function	References
				Average	Range	Base	Tip	Average	Range			
No. de Série	Nom de la sensille	Nom de l'insecte possédant la sensille	Localisation	Longueur (μ) (moyenne)		Largeur (μ) (moyenne)		Nombre		Caractéristiques ultrastructurales de la surface	Fonction possible	
				Moy. Fourchette		Base	Extrémité	Moy. Fourchette				
1	Sheathed sensilla <i>Sensille gainée</i>	<i>Antheraea assamensis</i>	Abdominal segments <i>Segments abdominaux</i>	275	—	10	7	4.5	4-5	Absence of striation presence of irregular sculpturing <i>Absence de striation, Présence de sculpture irrégulière</i>	Chemo-reception olfaction, mechano-reception <i>Chimio-réception, olfaction Mécano-réception</i>	Present work <i>Etude actuelle</i>
2	Sensilla chaetica	<i>Heliothis virescens</i>	Tarsus <i>Tarse</i>	122	80-165	15	2.7	21	20-22	Longitudinal ridges and secondary ridges <i>Arêtes longitudinales et arêtes secondaires</i>	Chemo-reception <i>Chimio-réception</i>	Backer & Ramaswamy (1990)
3	Sensilla chaetica	<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Antennal flagellum <i>Flagelle antennaire</i>	144	131-157	4	0.5	80	70-90	Presence of longitudinal and secondary ridges <i>Arêtes longitudinales et secondaires</i>	Mechano-reception <i>Mécano-réception</i>	Backer & Ramaswamy (1990)
4	Sensilla chaetica	<i>Homoesoma nebulella</i>	Proboscis	5.9	4.5-9.6	1.1	--	112	98-124	Longitudinal ridges <i>Arêtes longitudinales</i>	Chemo-reception <i>Chimio-réception</i>	Backer & Ramaswamy (1990)

Table II. (Continued ...)

Tableau II. (Suite...).

Sl. No.	Name of the sensilla	Name of the insect possessing the sensilla	Location	Length (μ) (average)		Width (μ)		Number		Surface ultra-structural features	Possible function	References
				Average Range		Base	Tip	Average Range				
No. de Série	Nom de la sensille	Nom de l'insecte possédant la sensille		Longueur (μ)		Largeur (μ)		Nombre		Caractéristiques ultrastructurales de la surface	Fonction possible	
			Localisation	Moy. Fourchette		Base Extrémité		Moy. Fourchette				
5	Sensilla chaetica type 1	<i>Graphium sarpedon</i>	Tibia and tarsal joints of pro-and meta-thoracic legs <i>Tibia et articulations tarsiennes des pattes pro et meta-thoraciques</i>	38	30-46	4.4	0.2	60	50-70	Smooth <i>Lisse</i>	Grooming <i>Nettoyage</i>	Dey <i>et al.</i> ,
6	Sensilla chaetica Type 2	<i>Graphium sarpedon</i>	Edges of coxa and trochanter <i>Bords de la coxa et du trochanter</i>	283	150-416	4.4	0.1	150	100-200	Smooth <i>Lisse</i>	Mechano-reception <i>Mecano-réception</i>	Dey <i>et al.</i> ,
7	Sensilla chaetica type 3	<i>Graphium sarpedon</i>	Tibia and tarsus <i>Tibia et tarse</i>	135	90-180	15	7.5	120	100-140	Presence of longitudinal and secondary ridges <i>Arêtes longitudinales et secondaires</i>	Chemo-reception <i>Chimio-réception</i>	Dey <i>et al.</i> , (1995)
8	Sensilla chaetica	<i>Antheraea assamensis</i>	Ventral portion of head, thoracic and abdominal cuticle <i>Partie ventrale de la tête, cuticule thoracique et abdominale</i>	600	400-800	20	4	100	80-120	Longitudinal ridges and secondary ridges <i>Arêtes longitudinales et secondaires</i>	Chemo-reception <i>Chimioréception</i>	S. Dey (1999)

Table III. Comparison of morphological features, distribution pattern and number of sheathed sensilla with those of sensilla basiconica of different insect species.

Tableau III. Comparaison des caractéristiques morphologiques, du schéma de distribution et du nombre de sensilles gainées avec celles de sensilla basiconica chez différentes espèces d'insectes.

Sl. No.	Name of the sensilla	Name of the insect possessing the sensilla	Location	Length (μ) Average	Width (μ) (average)		Number		Surface ultra-structural features	Possible function	References
					Base	Tip	Average	Range			
No. de Série	Nom de la sensille	Nom de l'insecte possédant la sensille	Localisation	Longueur (moyenne) (μ)	Largeur (moyenne) (μ)		Nombre		Caractéristiques ultrastructurales de la surface	Fonction possible	
					Base	Extrémité	Moy.	Fourchette			
1	Sheathed sensilla <i>Sensilles gainées</i>	<i>Antheraea assamensis</i>	Abdominal segment <i>Segment abdominal</i>	275	10	7	4.5	4-5	Absence of striation presence of irregular sculpturing <i>Absence de striation présence de sculpture irrégulière</i>	Chemo-reception olfaction, mechanoreception <i>Chimio-réception, olfaction mécano-réception</i>	Present work <i>Etude actuelle</i>
2	Broad-based, Non socketed sensilla <i>Sensille à base large sans cavité</i>	<i>Hypera postica</i>	Antennae <i>Antenne</i>	12	0.7	—	4	1-3	Smooth, uniporous <i>Lisse, à une pore</i>	Chemo-reception <i>Chimio-réception</i>	Bland (1983)
3	Sensilla basiconica	<i>Drosophila melanogaster</i>	Maxillary palp <i>Palpe maxillaire</i>	10	1.8	—	63	57-70	Porous <i>Poreuse</i>	Chemo-reception <i>Chimio-réception</i>	Singh & Nayak (1985)
4	Sensilla basiconica	<i>Homeosoma nebulella</i>	Antennae <i>Antenne</i>	18.4	1.8	0.6	648	620-667	Rough <i>Rugueuse</i>	Olfaction, chemo-reception <i>Olfaction, chimio-réception</i>	Backer & Ramaswamy (1990)
5	Sensilla basiconica	<i>Homeosoma nebulella</i>	Proboscis	2.9	1.4	0.1	52	47-63	Rough <i>Rugueuse</i>	Olfaction, chemo-reception <i>Olfaction, chimio-réception</i>	Backer & Ramaswamy (1990)

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

Sl. No.	Name of the sensilla	Name of the insect possessing the sensilla	Location	Length (μ) Average	Width (μ) (average)		Number		Surface ultra structural features	Possible function	References
					Base	Tip	Average	Range			
No. de Série	Nom de la sensille	Nom de l'insecte possédant la sensille	Localisation	Longueur (moyenne) (μ)	Largeur (moyenne) (μ)		Nombre		Caractéristiques ultrastructurales de la surface	Fonction possible	
					Base	Extrémité	Moy. Fourchette				
6	Sensilla basiconica	<i>Homeosoma nebulosa</i>	Ovipositor Ovipositeur	9.6	1.9	0.1	59	49-63	Rough Rugueuse	Chemo-reception Chimio-réception	Backer & Ramaswamy (1990)
7	Basiconic sensillum	<i>Drosophila-mela nogaster</i>	Antennae Antennes	4.5	1.2	0.2	7	—	Irregular sculpturing Sculpture irrégulière	Olfaction Olfaction	Itoh <i>et al.</i> , (1991)
8	Sensilla basiconica Type 1	<i>Graphium sarpedon</i>	Tibia and tarsal segments Segments du tibia et du tarse	11	3.7	1.6	12	10-14	Striated, porous Striée, poreuse	Olfaction	Dey <i>et al.</i> , (1995)
9	Sensilla basiconica Type 2	<i>Graphium sarpedon</i>	Tarso-tibial joint Articulation tarso-tibiale	5.9	2.7	0.6	5	4-6	Striated, porous	Olfaction Striée, poreuse	Dey <i>et al.</i> , (1995)
10	Sensilla basiconica Type 3	<i>Graphium sarpedon</i>	Tarso-tibial joint Articulation tarso-tibiale	3.3	1.3	0.6	4	2-6	Striated, porous Striée, poreuse	Olfaction	Dey <i>et al.</i> , (1995)
11	Sensilla basiconica Type 4	<i>Graphium sarpedon</i>	Last tarsal segment Dernier segment tarsien	2.3	1.3	0.3	35	30-40	Striated, porous Striée, poreuse	Olfaction, chemoreception Olfaction, chimio-réception	Dey <i>et al.</i> , (1995)
12	Sensilla basiconica Type 5	<i>Graphium sarpedon</i>	Last tarsal Dernier segment tarsien	4.6	1.5	0.6	43	40-46	Striated Striée	Olfaction	Dey <i>et al.</i> , (1995)
13	Sensilla basiconica	<i>Antheraea assamensis</i>	Head, thorax and abdomen Tête, thorax et abdomen	27	12	3.6	25	22-28	Striated Striée	Chemo reception Chimio-réception	S. Dey (1999)

Number:

The number of basiconic sensilla was found to vary depending upon the location, ranging from 2 to more than 1000 (Table III). Sheathed sensilla, in contrast, do not show such variations in its number and is localised specifically on the fourth and fifth abdominal segments only.

Surface ultra structural features:

The surface ultra-structural features of basiconic sensilla are characterized by striations, porosity, roughness, smooth uniporous surface, irregular undulations etc. (Table III). A comparison of surface features of the sheathed sensilla showed some similarities with certain basiconic sensilla described by earlier investigators.

DISCUSSION

Sensilla, the specialized cuticular sensory structures of insects are reported to occur in different body parts of insects and are known to perform a variety of functions (Alm and Hall, 1986; Altner and Prillinger, 1980; Dey *et al.* 1995; Dey and Biswas, 1996). There are different types of sensilla i. e. Sensilla trichodea, sensilla basiconica, sensilla styloconica, sensilla chaetica, sensilla campaniformai etc that are classified, on the basis of their morphological features and functional properties. The sensilla detected in the present study, could not however, be placed with any known insect sensilla reported so far, because of its morphological peculiarities. As for example, the sheathed sensilla was found to have similarities with sensilla trichodea and sensilla chaetica as far as the round shape of the well-developed socket is concerned. However, the surface striations, which are the characteristic features of sensilla trichodea and longitudinal as well as secondary ridges characteristics of sensilla chaetica (Faucheux, 1991 ; Baker and Ramaswari, 1990; French and Sanders, 1981) were missing. The surface features of the sheathed sensilla on the other hand, was found to be similar to certain types of sensilla basiconica, that are known to be associated with olfactory functions (Bland, 1983; George and Nagy, 1984; Coruau-Roy, 1991). The poke mark on the surface indicated the multi porous nature of the Sensilla and suggested its chemosensory and olfactory functions. However, the length of the sensilla was found to be much more than that of sensilla basiconica. Further, the presence of sheath in a region midway between base and tip was a unique feature that was not reported in any insect sensilla. Besides this, the sudden distention of the sensilla before reaching the tip was quite unusual. The flattened leaf-like shape of the region adjacent to the tip was also a unique feature of the sensilla, which has not been reported in sensory structure of any insect so far. Hence, the sheathed sensilla detected in the abdominal segments of the third instar larvae of *Antheraea assamensis* cannot be placed with any known insect sensilla. Although electrophysiological and other studies will be needed to ascertain the exact function of the sensilla, some important properties of it can be suggested on the basis of its morphological features, surface micro-structure and by considering the reports of earlier workers. The presence of sheath appears to be associated with flexibility of the proximal part ensuring its mechanoreceptive role, and maintaining the rigidity of the distal part by physically separating it from the corner. The flattened nature of some parts of the sensilla suggests the increase in contact receptive surface of the area as compared to the adjoining cylindrical part. A sheath separating the proximal and distal part, thereby making the distal part rigid, but proximal part flexible, indicate that there exists a division of labour in different parts of the sensilla, as far as the sensory functions are concerned.

CONCLUSION

The sensilla detected on the fourth and fifth abdominal segments of the third instar *Antheraea assamensis* larvae is a unique type of insect sensilla, having multi-functional property. The presence of such an advanced type of sensory structure reflects a very high degree of sensitivity of the silkworm, particularly from the third stage onwards and suggests that rearing of the worm under indoor environment from this stage onwards will necessitate proper attention in maintaining the exact physico-chemical conditions of the micro-environment of the worm, as available in its natural habitat.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Prof. B. Myrboh, Head, Regional Sophisticated Instrumentation Center, North-Eastern Hill University, Shillong for encouragement and interest in the work. One of us (SD) is thankful to North-Eastern Council Shillong for financial assistance to carry out the work.

REFERENCES

- ALBERT P. J. (1980) Morphology and innervation of the mouth part Sensilla in the larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem) (Lepidoptera Tortricidae). Can. J. Zool. 58: 842-851.
- ALM S. R. & HALL F. R. (1986) Antennal sensory structures of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). Ann. Entomol. Soc., Am., 324-333.
- ALTNER H., PRILLINGER L. (1980) Ultrastructure of invertebrate chemo-thermo and hygroreceptors and its functional significance. International Review of Cytology 67, 69-139.
- ATNER H, SASS H., ALTNER I., (1977) Relationship between structure and function of antennal chemo-, hygro- and thermo-receptive sensilla in *Periplaneta americana*. Cell and Tissue Research 176, 389-405.
- ALTNER H., SCHALLER-SELZER L., STETTER, H., WOHLRAB I., (1983) Poreless sensilla with flexible sockets: a comparative study of a fundamental type of insect sensilla probably comprising thermo and hygroreceptors. Cell and Tissue Research, 234, 279-307.
- BAKER G. T. & RAMASWAMY S. B. (1990) Tarsal and ovipositor sensilla of *Heliothis virescens* and *H. subflexa* (Lepidoptera: Noctuidae). Proc. Entomol. Soc. Wash; 92(3), 521-529.
- CALVERT H. & HANSON F. E. (1974) The role of sensory structures and pre-oviposition behaviour by the patch butterfly, *Chlosyne lacinia*. Entomol. Exp. Appl., 33, 179-87.
- CHAPMAN K. M. (1965) *Campaniform sensilla* on the tactile spines of the legs of the cockroach. J. Exp. Biol. 42, 191-203.
- CHOUDHURY S. N. (1981) Muga silk Industry, 1st ed. Directorate of Sericulture, Assam, India.
- CHOUDHURY P., DEY S., DUTTA B. K. & BHATTACHARJEE P. C. Ultrastructural (2001) details of the morphological adaptations of some tea pests of Assam (India), Entomon. 26(3 & 4). 227-238.
- DEY SUDIP (1999) Scanning electron microscopic detection of an unusual giant sensilla on the abdominal cuticle of the fifth instar larvae of the muga silkworm, *Antheraea assama*, Micron, 30/4, 339-348.
- DEY SUDIP, HOOROO R. N. K. & BISWAS N. (1997) Dendritic organization of prominent sensory structures of the first instar larvae of the muga silkworm (*Antheraea assamensis*), Cytobios, 92, 99-100.
- DEY, SUDIP HOOROO R. N. K., BISWAS N., RAGHUVARMAN A. & CHOUDHURY S. (1999) Cellular features of the muga silkworm, (*Antheraea assama*, Ww.) (Lepidoptera: Saturniidae), midgut and its possible impact on indoor rearing. Sericologia 39(4), 529-535.
- DEY SUDIP, SINGH SURENDRA, DHAR S., BIWAS N., CHAKRABORTY RAHUL, DAS P. K. & SHARMA D. K. (2002) Possible relationship between dorsal campaniform sensilla in head

- surface and preferred feeding posture of muga silkworm, *Antheraea assamensis* during indoor rearing. *Sericologia* 42(2), 171-180.
- FAUCHEAUX M. J. (1991) Morphology and distribution of sensilla on the cephalic appendages, tarsi and ovipositor of the European sunflower Moth, *Homoiesoma nebulella* Dena and Schiff (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Insect Morpho. Embryol.* 20 (6): 291-307.
- HONDA H. & HANUYA K. (1989) Scanning electron microscopy of an antennal sensilla of the yellow peach moth, *Conogethis punctiferalis* (Guenee) and *Conogethis* sp. (Lepidoptera: Pyralidae). *Jap. J. appl. Entomol. Zool.*, 33, 238-46.
- HAZARIKA L. K. & BORDOLOI S. (1998) Antennal and mouth part sensilla of the muga silkworm, *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae), *Sericologia*, 38(1), 55-63.
- HEINZEL H. G. & GEWECKE M. (1979) Directional sensitivity of the antennal Campaniform sensilla in locusts. *Naturwissenschaften*, 66, 212-213.
- HUSTERT R., PFLUGER H. J. & BRAUNING P. (1981) Distribution and specific central projections of mechanoreceptors in the thorax and proximal leg joints of locusts III. The external mechanoreceptors: the campaniform sensilla. *Cell Tissue Res.* 216, 97-111.
- Mc INDOO N. E. (1914) The olfactory sense of the honey-bee. *J. ExcpZool*; 16, 265-346.
- Mc INDOO N. E. (1922) The auditory sense of the honey bee. *J. Comp Neurol.* 34, 173-199.
- McIVER, S. b. (1975) Structure of cuticular mechanoreceptors of arthropods. *A Rev. Ent.* 20, 381-397.
- McIVER S. B. (1985) Mechanoreception. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. 6 (Nervous System: sensory) (ed. G. A. Kerkut & L. I. Gilbert) pp, 71-132. Oxford: Pergamon Press.
- MORAN D. T. & ROWLEY J. C. (1975) High voltage and scanning electron microscopy of the site of stimulus reception of an insect mechanoreceptor. *J. Ultrastruct. Res.* 50, 38-46.
- PEARSON K. G. (1972) Central programming and reflex control of walking in the Cockroach. *J. Exp. Biol.* 56, 173-193.
- PRINGLE J. W. S. (1983) Proprioception in insects II. The Action of the campaniform sensilla on the legs. *J. Exp. Biol.* 15, 114-131.
- SCHMIDT J. M. & SMITH J. J. B. (1987) The external morphology of the legs and hair plate system of female *Trichogramma minimum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) *Proc. R. Soc. Lond. B* 232, 333-366.
- SCHNEIDER D. (1964) Insect Antennae. *Annual Rev. Entomol.* 9, 103-122.
- SEITZ A. (1933) *The Macrolepidoptera of the World*, Alfred Keren publishers, Stuttgart, Vol, 10 p.
- SLIFER E. H. (1970) The Structure of Arthropod Chemoreceptors. *Annual Rev. Entomol.* 15, 121-142.
- SONDGRASS R. A. (1935) *Principles of Insect Morphology*, New York, Mc Graw-Hill.
- SPINOLA S. M. & CHAPMAN K. M. (1975) Proprioceptive Indentation of Campaniform Sensilla of Cockroach Legs. *J. Comp. Physiol.* 95, 257-272.
- THANGAVELU K. & SAHU A. K. (1986) Further Studies on the indoor rearing of muga silkworm (*Antheraea assama* Ww) (Saturnidae: Lepidoptera) *Sericologia*, 26(2): 215-224.
- THURM U., STEDTLER A. & FOELIX R. (1975) Reizwirksame Verformugender Terminal- struckturen eniers Mechanorezeptors, *Verh. Dt. Zool. Ges.*, 37-41.
- YADAV G. S. & GOSWAMI B. C. (1999) Correlation and regression studies between different quantitative characters of muga silkworm *Antheraea assamensis* (Helfer) during two crops. *Bull. Ind. Acad., Seri.* 3(2), 12-20.
- ZILL S. N. & MORAN D. T. (1981) The exoskeleton and insect proprioception. I. Responses of tibial campaniform sensilla to external and muscle generated forces in American cockroach, *Periplaneta americana*, *J. exp. Biol.* 94, 57-75.

UNE SENSILLE UNIQUE SUR LA SURFACE ABDOMINALE DU VER À SOIE MUGA, *ANTHRAEA ASSAMENSIS* (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE)

SURENDRA SINGH¹, SUDIP DEY^{*1}, D. K. SHARMA², A. RAGHUVARMAN³ &
R. CHAUDHURY⁴

1. Regional Sophisticated Instrumentation Centre, North Eastern Hill University,
Shillong – 793 003, Inde.

2. Department of Zoology, Gauhati University, Guwahati 14, Inde.

3. Department of Zoology, North-Eastern Hill University, Shillong, -793 0022, Inde.

4. Central Silk Board Extension Centre, Nongpoh, Inde.

Les études de microscopie électronique à balayage révèlent la présence d'une sensille unique sur le quatrième et le cinquième segment abdominal du ver à soie muga du troisième âge. Les caractéristiques morphologiques de la sensille s'avèrent être uniques dans le sens où elle n'a aucune ressemblance absolue avec aucune sensille d'insecte décrite jusqu'à présent. En raison de ses particularités morphologiques, on ne peut pas classer la sensille parmi aucune sensille d'insecte, c'est à dire sensilla trichodea, sensilla basiconica, sensilla chaetica etc. décrite jusqu'à présent. Nous discutons ici la signification fonctionnelle possible de la sensille chez le ver à soie muga à l'aide de la littérature disponible.

INTRODUCTION

Antheraea assamensis (ver à soie muga) est un insecte semi-domestiqué, polyvoltin et polyphage donnant six générations dans l'année (Seitz, 1993). Le ver à soie est propre à l'Assam et à d'autres états attenants du nord-est de l'Inde. Sur les six générations du ver à soie muga, seules deux sont populaires pour les élevages commerciaux (Yadav et Goswami, 1999) qui sont réalisés en mai-juin et en octobre-novembre en raison des conditions climatiques favorables. Le ver à soie muga a un certain comportement général caractéristique en réponse aux conditions climatiques uniques dans sa région d'habitat (Choudhury, 1981). Il n'est donc pas possible de l'élever en dehors du nord-est de l'Inde. De plus, les essais d'élevage à l'intérieur (Thangavelu et Sahu, 1986) ne sont pas très encourageants sur le plan commercial en raison de certains problèmes associés.

Dans ce contexte, on doit noter que la diversité d'adaptation d'un insecte s'exprime mieux par la spécialisation chimique et structurelle de la cuticule chitineuse recouvrant le corps (Neville, 1975), qui varie entre les différentes espèces et aussi en fonction des différentes parties corporelles.

Les sensilles ou les structures cuticulaires spécialisées sont présentes dans différentes parties du corps des insectes et on sait qu'elles participent à un ensemble de fonctions (Bland, 1983 ; George et Nagy, 1984 ; Alm et Hall, 1986 ; Crouau et Crouau-Roy, 1991 ; Dey et coll., 1999 ; Choudhury et coll., 2001). Bien que des études poussées aient été réalisées sur la sensille d'un certain nombre de lépidoptères (adultes et larves), très peu de rapports sont disponibles à ce sujet chez le ver à soie muga, *Antheraea assamensis* (Dey et coll., 1997 ; Hazarika et Bordoloi, 1998 ; Dey, 1999 ; Dey et coll.,

* Auteur auquel adresser la correspondance.

2002). Dans ce contexte, on doit noter que la morphologie, le comportement et l'écophysiologie du ver à soie muga, *Antheraea assamensis* sont censés être différents de ceux des autres espèces (Choudhury, 1981).

Il apparaît que la première étape pour comprendre la complexité du comportement d'un insecte est l'examen de ses structures sensorielles. Cette étude se penche donc sur la recherche des particularités des structures sensorielles qui pourraient être liées à l'écophysiologie et au comportement caractéristiques du ver à soie muga.

MATERIELS ET METHODES

On utilise le morphotype le plus courant, c'est à dire des larves du troisième âge du morphotype vert. On amène des spécimens vivants de la Ferme Muga d'Etat, Gouvernement de l'Assam au Laboratoire de Microscopie Electronique. On sacrifie les vers en les exposant à des vapeurs de benzène. On coupe les segments abdominaux en petits morceaux et on les fixe dans du glutaraldehyde à 2,5 % préparé dans un tampon cacodylate de sodium à 0,1 M pendant 4h à 4° C. On lave les échantillons avec le tampon, on les déshydrate par séries de concentrations en acétone et on les sèche au point critique dans un séchoir à point critique Samdri PVT3 (Tousimis) en utilisant de l'acétone comme fluide intermédiaire et du dioxyde de carbone comme fluide transitionnel. On fixe les échantillons séchés horizontalement par rapport au montant en cuivre (diamètre de 10 mm × hauteur de 30 mm) en utilisant du ruban adhésif à double face, relié à un morceau de peinture argent pour assurer la charge de la conduction. On fait attention d'éviter les bulles d'air emprisonnées à l'intérieur. On applique une fine couche d'or conducteur à l'échantillon en utilisant un pulvérisateur d'ions JFC 1100 (Jeol), à un vide relativement faible de 10^{-3} torr dans la chambre de pulvérisation. On examine les échantillons recouverts avec un microscope électronique à balayage JSM-35CF (Jeol) fonctionnant à 15KV. On fixe le témoin à bascule à 0 degré pour fixer le spécimen en position horizontale, on utilise le sélecteur de distance de travail (WD) pour fixer la WD à 15 mm. On utilise en tout 15 larves individuelles dans cette étude. On procède à une comparaison sur la longueur, la largeur, les caractéristiques structurales de la cavité, l'ultra-structure de la surface etc. entre la sensille détectée dans le segment abdominal du ver à soie muga et ceux des autres insectes décrits par différents auteurs.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le quatrième et le cinquième segment abdominal des larves du troisième âge présentent environ 4 à 5 sensilles uniques avec des caractéristiques morphologiques bien définies, non rapportées chez aucune sensille d'insecte jusqu'à présent. Il s'avère que la longueur totale de la sensille est d'environ 275 µm. La cavité est bien développée, ronde et avec un diamètre d'environ 22 µm (Fig. 1, 2). A une distance d'environ 107 µm de la base, la sensille présente une structure comme une gaine liant les parties proximale et distale. Près de la gaine, la sensille s'avère plus fine en largeur (5 µm) dans la zone proximale par comparaison à la partie distale (12,5 µm) (Fig. 1). Dans cette partie encore, la sensille vers l'extrémité est plus large (15 µm) jusqu'à environ une distance de 50 µm menant à une extrémité étroite (7 µm de largeur) (Fig. 1). La surface de la partie la plus grande de la sensille présente certaines ondulations et plis indiquant une grande surface pour la réception des stimuli sensoriels (Fig. 4). Des pores minuscules innombrables présents partout suggèrent la nature multiporeuse de la sensille (Figs. 1, 2, 3). Toute la partie distale de la gaine présente une nature cylindrique, tandis que la partie proximale y compris l'extrémité semblent plates (Figs 1, 5, 6). Les particularités de la sensille gainée par comparaison aux autres types de sensilles sont bien reconnues.

Comparaison avec sensilla trichodea :

Longueur et largeur :

Le Tableau I montre les données comparatives sur la longueur et la largeur de la sensille gainée détectée dans cette étude par comparaison à celles de *Sensilla trichodea* (Fig. 7) décrites chez des insectes variés par différents auteurs.

Il s'avère que la longueur maximum de *Sensilla trichodea* décrite chez un autre insecte s'avère inférieure à celle de la sensille gainée rapportée dans cette étude. Cependant, on trouve que certaines sensilla trichodea dans le segment abdominal du ver à soie muga s'avèrent plus longues (Dey, 1999) par comparaison à la longueur générale du *Sensilla trichodea* courant.

La largeur de la sensille détectée dans cette étude s'avère plus importante que celle de la sensilla trichodea décrite chez un autre insecte. On trouve que la largeur de la sensilla trichodea chez la plupart des insectes est comprise entre 3 à 10 μm à la base et 0,9 à 4 μm à l'extrémité. Par opposition, la largeur de la sensille gainée détectée dans cette étude est d'environ 10 μm à la base et de 7 μm à l'extrémité.

Nombre :

Le nombre de sensilles détectées dans cette étude est d'environ de 4 à 5 sur le quatrième et le cinquième segment abdominal. A l'opposé, les sensilla trichodea chez d'autres insectes sont décrites à des endroits variés du corps et leur nombre s'avère beaucoup plus élevé (Tableau I).

Ultra-structure de la surface :

La fig. 1 montre les caractéristiques ultra-structurales de la surface d'une sensilla trichodea typique d'une larve de 5^{ème} âge du papillon muga à différents endroits du corps. La sensilla trichodea est caractérisée par la présence de striations longitudinales, qui ne sont pas présentes sur la sensille gainée observée dans cette étude. Les données comparatives sur les caractéristiques de l'ultrastructure de la surface de la sensille gainée et des différents types de sensilla trichodea décrits chez des insectes variés par plusieurs chercheurs sont présentées dans le Tableau I.

Comparaison avec sensilla chaetica :

Longueur et largeur :

Le Tableau II présente une comparaison entre la longueur et la largeur de la sensille gainée et celles de sensilla chaetica (Fig. 8). On observe que la sensille gainée est plus longue que la plupart des sensilla chaetica décrites chez d'autres insectes, sauf celle du papillon *Graphium sarpedon* détectée sur le bord coxal et trochantéral et chez les larves du 5^{ème} âge d'*Antheraea assamensis* sur la tête, le thorax et la cuticule de l'abdomen. La largeur de sensilla chaetica (base et extrémité) décrite chez d'autres insectes s'avère aussi inférieure à celle de la sensille gainée sauf celle de la larve du ver à soie muga que nous avons rapportée ailleurs.

Nombre :

Le nombre de sensilla chaetica est en général plus élevé que celui des sensilles gainées détectées dans cette étude.

Caractéristiques ultrastructurales de la surface :

Les caractéristiques ultrastructurales de la surface de sensilla chaetica sont censées se matérialiser par la présence d'une surface avec des rainures longitudinales et des striations circulaires (Fig. 8), qui sont absentes de la surface de la sensille gainée (Fig. 1).

Comparaison avec sensilla basiconica :

Longueur et largeur :

Les sensilles basiconiques sont en général beaucoup plus courtes que sensilla chaetica et sensilla trichodea. Leur largeur à la base et à l'extrémité est aussi beaucoup plus petite. La longueur et la largeur des sensilles gainées détectées dans cette étude, qui sont plus longues et plus larges que chez

sensilla trichodea et sensilla chaetica sont évidemment bien plus grandes que chez les sensilla basiconiques (Tableau III).

Nombre :

Le nombre de sensilles basiconiques varie en fonction de l'emplacement et il est compris entre 2 et plus de 1000 (Tableau III). A l'opposé, les sensilles gainées, ne présentent pas de variation du nombre et ne sont localisées spécifiquement que sur le quatrième et sur le cinquième segment abdominal.

Caractéristiques de la surface ultrastructurale :

Les caractéristiques ultrastructurales de la surface des sensilla basiconica sont des striations, une porosité, une rugosité, une surface lisse uniporeuse, des ondulations irrégulières, etc (Tableau III). Une comparaison des caractéristiques de la surface de la sensille gainée montre des similitudes avec certaines sensilla basiconiques décrites précédemment par des chercheurs.

DISCUSSION

On a rapporté que les sensilles, les structures cuticulaires spécialisées des insectes sont présentes dans différentes parties du corps des insectes et sont censées réaliser un ensemble de fonctions (Alm et Hall, 1986 ; Altner et Prillinger, 1980 ; Dey et coll., 1995 ; Dey et Biswas, 1996). Il y a différents types de sensilles, c'est à dire Sensilla trichodea, sensilla basiconica, sensilla styloconica, sensilla chaetica, sensilla campaniformai etc. qui sont classifiées sur la base de leurs caractéristiques morphologiques et de leurs propriétés fonctionnelles. Cependant, les sensilles détectées dans cette étude ne s'apparentent à aucune des sensilles d'insectes rapportées jusqu'à présent en raison de leurs particularités morphologiques. Ainsi par exemple, la sensille gainée semble avoir des similitudes avec sensilla trichodea et sensilla chaetica en ce qui concerne la forme ronde de la cavité bien développée. Cependant, les striations de surface longitudinales qui sont les caractéristiques de sensilla trichodea ainsi que les crêtes secondaires caractéristiques de sensilla chaetica (Fauchaux, 1991 ; Baker et Ramaswari, 1990 ; French et Sanders, 1981) sont absentes. Les caractéristiques de la surface de la sensille gainée d'autre part, s'avèrent similaires à certains types de sensilla basiconica, qui sont censées être associées à des fonctions olfactives (Bland, 1983 ; George et Naguy, 1984 ; Coruau-Roy, 1991). Le poinçon sur la surface indique la nature multi poreuse de la sensille et suggère ses fonctions chemosensorielles et olfactives. Cependant, la longueur de la sensille s'avère être beaucoup plus importante que celle de sensilla basiconica. De plus, la présence d'une gaine dans la zone à mi-chemin entre la base et l'extrémité est une caractéristique unique que l'on n'a rapportée chez aucune sensille d'insecte. En plus de cela, la distension soudaine de la sensille avant d'atteindre l'extrémité est assez inhabituelle. La forme aplatie comme une feuille de la zone proche de l'extrémité est aussi une caractéristique unique de la sensille, que l'on n'a pas rapportée dans la structure sensorielle d'aucun insecte jusqu'à présent. Ainsi, la sensille gainée détectée dans les segments abdominaux de la larve de troisième âge d'*Antheraea assamensis* ne s'apparente à aucune sensille d'insecte connue. Bien qu'il faudra des études électrophysiologiques et autres pour s'assurer de la fonction exacte de la sensille, on peut suggérer certaines propriétés importantes sur la base de ses caractéristiques morphologiques, de la micro-structure de la surface et d'après les précédentes études de chercheurs. La présence d'une gaine semble être associée à la flexibilité de la partie proximale, ce qui assure son rôle de mécanorécepteur et le maintien de la rigidité de la partie distale en la séparant physiquement du coin. La nature aplatie de certaines parties de la sensille suggère l'augmentation de la surface réceptive de contact de la zone par comparaison à la partie cylindrique attenante. Une gaine séparant la partie proximale et distale, qui rend donc la partie distale rigide mais la partie proximale flexible, indique qu'il existe une division du travail dans différentes parties de la sensille, en ce qui concerne les fonctions sensorielles.

CONCLUSION

La sensille détectée sur le quatrième et cinquième segment abdominal du troisième âge d'*Antheraea assamensis* est un type unique de sensille d'insecte, ayant des propriétés multi-fonctionnelles. La présence d'un tel type de structure sensorielle reflète un degré très élevé de sensibilité du ver à soie, particulièrement à partir du 3^{ème} âge et suggère que pour élever le ver à l'intérieur à partir de ce stade, il faut faire attention à maintenir les mêmes conditions physico-chimiques du micro-environnement du ver que dans son habitat naturel.

STUDIES ON REELING - INFLUENCE OF COCOON COOKING CONDITION AND CROISSURE LENGTH ON QUALITY CHARACTERISTICS OF RAW SILK OF INDIAN MULTIBIVOLTINE COCOONS

SUBHAS V. NAIK* & T. H. SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute (CSTRI), Central Silk Board, BTM Layout,
Madiwala Bangalore – 560 068, India.

The influence of cocoon cooking condition and croissure length on certain quality characteristics of raw silk has been studied for Indian multibivoltine cocoons. Study has been carried out using two cooking methods i.e., single pan and pressurised and three levels of croissure length – 3 cm, 8 cm and 13 cm. It is observed that cocoon cooking condition has significant influence on quality of silk. The croissure length has significant influence on reeling tension and quality characteristics of raw silk viz. neatness, cleanness, tenacity and cohesion of raw silk. Single pan cooking and shorter croissure length of 3cm affect the quality of raw silk significantly. As the croissure length increases, tenacity, cleanness and cohesion of raw silk are found to increase significantly. The quality characteristics of raw silk viz., neatness, cleanness, tenacity, elongation and cohesion have been found to be significantly better in the case of pressurised cooking and 8 and 13 cms croissure length. Results indicate that cooking the cocoons to the required level and maintaining the good croissure length of 8 to 13 cm are essential for producing better quality silk.

Keywords: Cooking method, croissure length, cleanness, tenacity, cohesion.

INTRODUCTION

Croissure, the mechanism for intertwining the cocoon filaments round itself in a series of spirals during its passage from reeling basin to the reel during reeling the cocoons is one of the important aspects of reeling and its length is one of the important process parameters.

Croissure length influences cohesion and tenacity of raw silk. Croissure length required for producing quality silk is expected to be dependent on cocoon quality and appropriate thread passage is essential to introduce better croissure length.

Standardization of croissure length for a given thread passage is essential for achieving better quality raw silk. Studies have been conducted in Japan on the influence of croissure length on the properties of raw silk in automatic reeling machines associated with conveyor cooking in respect of bivoltine hybrid cocoons (Sumiza *et al.* 1966, Arimoto 1959, 1960). Similar information on the influence of variation in cooking condition and croissure length in the case of CSTRI multiend reeling, particularly for Indian multibivoltine cocoons is scanty.

The present study focuses on the influence of cocoon cooking condition and croissure length on the reeling performance and properties of raw silk.

* Author to whom correspondence may be addressed.

MATERIALS AND METHODS

Raw Material:

Multivoltine cocoons (PM × NB₄D₂) procured from the Government Cocoon markets were used for the study.

Experimental design:

The study has been carried out varying two factors viz. the **cocoon cooking methods (factor A, 2 levels)** and **croissure length (factor B, 3 levels)**, keeping the other parameters constant.).

Cocoon drying:

The cocoons were hot air dried in a batch type drier following a temperature profile of 115°C to 55°C for four and half hours.

Cocoon cooking:

Two cocoon cooking conditions (open pan and pressurised cooking method) were used to vary the cocoon cooking degree.

In the case open pan method, using a single pan, cocoons were cooked at 95° C for 2 minutes.

The pressurised cooking of cocoons was carried out using CSTRI pressurised circular cooking machine by employing following cooking parameters.

- | | | |
|---|---------------|-------------|
| 1. Retting temperature & duration : | 70°C, | 45 seconds |
| 2. High temperature steam treatment and duration: | 90°C, | 30 seconds |
| 3. Low temperature water permeation treatment and duration: | 75°C, | 45 seconds |
| 4. Cooking temperature and duration : | 95°C, | 30 seconds |
| 5. Adjustment temperature and duration : | 95°C to 75°C, | 240 seconds |

Brushing:

Cooked cocoons were brushed in water at 80° C.

Reeling:

The cocoons were reeled on CSTRI Multiend reeling machine by maintaining three levels of croissure length i. e. **3cms, 8cms and 13cms**. While putting croissure, 12 turns/cm were introduced in all the cases. Following other reeling parameters were kept constant.

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| Reeling speed : | 100 mtrs/ min |
| Basin water temperature: | 40°C |
| CSTRI reeling buttons with | 250 microns hole diameter. |

Small reel permeation:

Small reels are soaked in water using CSTRI small reel vacuum permeation chamber using vacuum pressure of 300 mm Hg. The cycle is repeated for three times.

Re-reeling:

Raw silk was re-reeled using CSTRI closed type re-reeling machine with re-reeling speed of 225 rpm, 40°C temperature and 45% RH in re-reeling machine.

Water quality:

Water having 7.1 pH, 70 ppm Hardness and 80 ppm Alkalinity was used for the study.

Raw silk testing:

The raw silk samples were tested for Cleanness, Neatness and Low neatness characteristics using Seriplane tester and Cohesion character using Duplan Cohesion tester adopting ISA procedure. Further, Tenacity and Elongation of raw silk were tested using Instron tensile tester following standard procedure.

Statistical analysis:

The data collected were statistically analysed using two-way analysis of variance.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Average results of influence of cocoon cooking condition and croissure length on quality characteristics of raw silk of multibivoltine cocoons are given in Table I and II. Analysis of variance of quality characteristics of raw silk are given in Table III.

Table I. Influence of cocoon cooking condition and croissure length on quality characteristics of raw silk of multibivoltine cocoons.

Tableau I. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la longueur de la croisure sur les caractéristiques de qualité de la soie grège des cocons polybivoltins.

Croissure Length (cms)	Neatness (%)		Low neatness (%)		Cleanness (%)	
	Open pan Cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking
	Netteté (%)		Netteté minimum (%)		Propreté (%)	
	Cuisson à la bassine ouverte	Cuisson pressurisée	Cuisson à la bassine ouverte	Cuisson pressurisée	Cuisson à la bassine ouverte	Cuisson pressurisée
Longueur de croisure (cms)						
3	85.0	88.0	77.5	82.5	85.2	92.7
8	86.5	88.5	80.0	85.0	88.3	94.7
13	88.0	89.5	80.0	85.0	89.5	95.0
CD (P ≤ 0.05) for cooking methods (A) <i>pour les méthodes de cuisson (A)</i>	1.4		2.9		0.6	
for croissure length (B) <i>pour la longueur de croisure (B)</i>	1.7		3.5		0.7	
A × B	2.3		5.0		1.1	

Table II. Influence of cocoon cooking condition and croissure length on reeling tension and quality characteristics of raw silk of multibivoltine cocoons.

Tableau II. Influence de la condition de cuisson et de la longueur de croisure sur la tension de dévidage et les caractéristiques de la soie grège des cocons polybivoltins.

Croissure length (cms)	Reeling tension (g/d)		Tenacity (g/d)		Elongation (%)		Cohesion (No. of strokes)	
	Open pan Cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking
	<i>Tension de dévidage (g/d)</i>		<i>Ténacité (g/d)</i>		<i>Allongement (%)</i>		<i>Cohésion (Nbre de coups)</i>	
<i>Longueur de croisure (cms)</i>	<i>Cuisson à la bassine ouverte</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>	<i>Cuisson à la bassine ouverte</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>	<i>Cuisson à la bassine ouverte</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>	<i>Cuisson à la bassine ouverte</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>
3	0.342	0.335	3.73	3.80	20.75	23.05	32	45
8	0.415	0.386	3.81	3.90	20.60	22.70	61	74
13	0.450	0.416	3.99	4.05	20.35	22.50	64	80
CD (P ≤ 0.05 for cooking methods (A) <i>pour les méthodes de cuisson (A)</i>	0.005		0.02		0.31		3	
for croissure length (B) <i>pour la longueur de croisure (B)</i>	0.006		0.03		0.38		4	
A × B	0.008		0.04		0.54		6	

Neatness and low neatness of raw silk

Results given in the Table I indicate that cocoon cooking method has a significant influence on neatness and low neatness of raw silk. The influence of cocoon cooking method on neatness and low neatness of raw silk is significant at 1% level, whereas the influence of croissure length on neatness of raw silk is significant at 5% level (Table III). Significant improvement in neatness and low neatness of raw silk in the case of pressurized cooking method is attributed to better and uniform swelling and softening of sericin of all the cocoon filament layers in the cocoon shell.

Cleanness of raw silk

Table I shows that both cocoon cooking method and croissure length have a significant influence on cleanness of raw silk. The influence of cocoon cooking method on cleanness of raw silk is significant at 1% level, whereas influence of croissure length on cleanness of raw silk is significant at 5% level (Table III).

Table III. Analysis of variance of quality characteristics of raw silk of multibivoltine cocoons.**Tableau III. Analyse de variance pour les caractéristiques de qualité de la soie chez les cocons polybivoltins.**

Factors	Mean sum of squares						
	Degree of Freedom	Neatness	Low neatness	Cleanness	Tenacity	Elongation	Cohesion
Facteurs	Somme moyenne des carrés						
	Degrés de liberté	Netteté	Netteté minimum	Propreté	Ténacité	Allongement	Cohésion
Cooking methods (A) <i>Méthodes de cuisson (A)</i>	1	14.083**	75.000**	124.808**	0.0161**	14.301**	602.083**
Croissure length (B) <i>Longueur de croissure (B)</i>	2	5.083*	8.333 ^{NS}	11.911**	0.0683**	0.226	1301.583**
A × B	2	0.583 ^{NS}	0.000 ^{NS}	1.007 ^{NS}	0.0002 ^{NS}	0.011 ^{NS}	2.583 ^{NS}
Error / <i>Ecart</i>	6	0.917	4.167	0.197	0.0003	0.049	6.083

** Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %.** Significatif at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %.*NS: Non significant / *Non significatif.*

It is observed that as the croissure length increases from 3 cm to 13 cms, cleanness of raw silk is found to increase significantly. This is presumably due to removal of some of the cleanness defects (like slugs and waste) by a longer croissure during reeling. During reeling it is observed that, whenever some cleanness defects occur in the thread and passes through a croissure length of 8 cms & 13 cms, individual reel stop motion was activated or there was a thread breakage under croissure tension due to longer croissure length. But this phenomenon was not observed when the croissure length was 3 cms.

CD values (Table I) show that differences in cleanness character of raw silk between 3 cm, 8 cm & 13 cm croissure length are significant at 5% level. Results indicate that longer croissure length helps to a great extent in improving the cleanness of raw silk. The pressurised cooking method has given significantly better cleanness of raw silk as compared to the open pan cooking method. This is attributed to better swelling and softening of sericin of cocoon filament crossover points in the cocoon shell in the case of pressurized cooking method.

Tenacity of raw silk

The results given in the table II show that tenacity of raw silk increases with the increase in croissure length. The pressurised cooking method and 13 cm croissure length have given better tenacity of raw silk as compared to the other conditions.

The results of the analysis of variance (Table III) indicate that both cocoon cooking method and croissure length have significant influence on tenacity of raw silk at 1% level. It is observed from the

CD values (Table II) that differences in tenacity of raw silk between 3 cm, 8 cm and 13 cm croissure length are significant at 5% level.

Increase in tenacity with the increase in croissure length is attributed to increase in reeling tension as the croissure length increases (Table II). Increased reeling tension may have resulted in better orientation of fibrils in the fibroin of a cocoon filament leading to increased tenacity of raw silk. It is to be noted that raw silk will become more compact and circular as the croissure length increases (Arimoto 1959, 1960). Increase in tenacity may also be due to the fact that as the croissure length increases agglutination force between the filaments can be expected to increase and yarn will become more compact and stronger.

The pressurized cooking method has given significantly better tenacity of raw silk as compared to that of open pan cooking method (Table II). This can be attributed to better swelling and softening of sericin of filament crossover points in the cocoons in the case of pressurized cooking method as compared to under/uneven cooking of cocoons in the case of open pan method. This may also be attributed to the fact that sericin dissolution in the case of pressurized cooking method is more as compared to the open pan method leading to a decrease in denier and therefore an increase in tenacity of raw silk in the case of pressurized cooking method.

Elongation of raw silk:

The results of the analysis of variance (Table III) indicate that the influence of croissure length on elongation of raw silk is insignificant. However, there is a slight decrease in the elongation of raw silk as the croissure length increases (Table II). This may be due to increase in reeling tension as the croissure length increases. However, it is observed that elongation of raw silk is good with all the three levels of croissure length i.e., 3 cms, 8 cms and 13 cms. Results indicate that maintaining good croissure length during reeling will not come in the way of achieving good elongation of raw silk.

Pressurized cooking method has given significantly better elongation of raw silk as compared to that of open pan cooking method (Table II). This can be attributed to better and uniform swelling and softening of sericin of cocoon filament cross over points and all the filament layers of cocoon shell. Significant reduction in elongation of raw silk in the case of single pan cooking method is attributed to under cooking of cocoons. Under cooking of cocoons increases the cocoon filament exfoliation tension, which in turn increases the total reeling tension (Takabayashi *et al.*, 1995). Higher reeling tension appears to have affected the elongation of raw silk.

Cohesion of raw silk

Results given in the Figure 1 and Table III show that both cocoon cooking method and croissure length have significant (at 1% level) influence on cohesion of raw silk. As the croissure length increases cohesion of raw silk is found to increase significantly (Figure 1). The cohesion of raw silk at 3 cms croissure length associated with open pan cooking method is very poor, whereas croissure length of 13 cms in association with pressurized cooking method has given maximum cohesion of raw silk. CD values (Table II) indicate that differences in cohesion of raw silk between 3 cms, 8 cms and 13 cms croissure length are significant at 5% level.

Increase in cohesion of raw silk with the increase in the croissure length is due to the fact that when the filaments from the cooked cocoons pass through the croissure of good length during reeling, the required agglutination of the filaments in the raw silk will take place (because of sufficient binding force exerted by croissure) and this results in good cohesion of raw silk. It is to be noted that at the twisted parts (croissure) friction is developed between two threads as they move together in the twisted path in the same direction. This will contribute to increasing the agglutination between cocoon filaments and hence the cohesion of raw silk.

Fusahichi Nakagawa (Takashi Omura 1981) has developed a relation between the tension in the thread before passing through the croissure and the tension in the thread after the thread passes through the croissure during reeling.

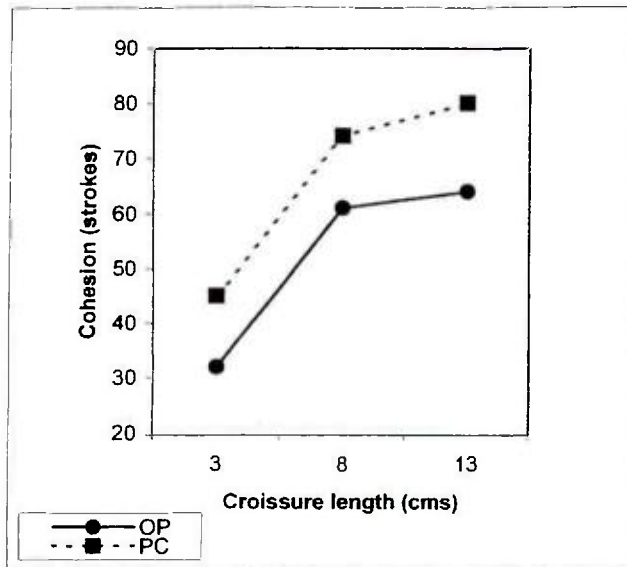


Figure 1. Influence of cocoon cooking condition and croissure length on cohesion of raw silk.

Figure 1. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la longueur de croissure sur la cohésion de la soie grège.

$$T = T_0 \frac{\sin \delta}{\sin \theta} \times \frac{\sin \beta}{\sin \alpha} - b \frac{\sin \beta}{\sin \alpha}$$

T = Raw silk tension in reeling

T₀ = Tension at the button

b = Resistance of croissure pulleys (1st and 2nd)

α, β = Top croissure angles

δ, θ = Bottom croissure angles.

It is observed that pressurized cooking method has given significantly better cohesion of raw silk as compared to open pan method (Figure 1). This is due to better swelling and softening of sericin of cocoon filament layers in the case of pressurized cooking method due to effective cooking of cocoons. It is to be noted that proper agglutination of filaments in the raw silk thread will take place only when the sericin of cocoon filament layers is properly softened (Subhas 1995). Reduction in cohesion of raw silk in the case of open pan cooking method is attributed to under/uneven softening of sericin. Results indicate that both cooking of the cocoons to the required level and maintaining good croissure length are essential for achieving good cohesion of raw silk.

CONCLUSION

The croissure length has significant influence on certain quality characteristics of raw silk, whereas cocoon cooking (method) condition influences significantly both reeling and raw silk quality characteristics. In order to achieve raw silk with good cohesion, tenacity and cleanness characteristics, effective cooking of cocoons and introducing/maintaining required length of croissure during reeling process is very much essential.

Results indicate that by cooking the cocoons to the required level and by maintaining 8-13 cm croissure length (for the production of medium denier raw silk with 100-120 m/min reeling speed) in the case of CSTR multiend reeling machine better quality characteristics of raw silk i. e. Cohesion, tenacity & cleanness can be achieved. Further, pressurized cooking method is having distinct advantage over open pan method in achieving better raw silk recovery and quality of raw silk of superior grade.

REFERENCES

- SAMIZU, MURAYAMU, SATO & KAWASAKI (1966) "Effect of reeling speed and croissure on raw silk quality and reeling process", cocoon testing technology research association Magazine Vol.32 1-9.
- TAKABAYASHI.C, SUBHAS.V.NAIK & H. TSUBOI (1996) "Influence of cocoon cooking conditions on variation of cocoon filament exfoliation tension" J.Seric.Sci., Jpn, .65, No.4, 278-285. SUBHAS V.NAIK, TAKABAYASHI.C., Tsuboi. H. and Somashekar.T.H (1995) "Influence of cocoon cooking temperature on Cohesion of raw silk" Sericologia 35(3), 513-520.
- TAKASHI OMURA T, (1981) "Silk reeling techniques in tropics (Japan International Co-operation Agency, Tokyo, Japan) 1981, 217-218.
- HAJIME ARIMOTO (1959) Effect of croissure and reeling velocity on the cross section of raw silk (part-I), Japan Sericulture Science Magazine No.28-5 P.327-331.
- HAJIME ARIMOTO (1960) Effect of croissure and reeling velocity on the cross section of raw silk (part-II), Japan Sericulture Science Magazine No.29-5 P.98-101.

ETUDES SUR LE DEVIDAGE - INFLUENCE DE LA CUISSON DES COCONS ET DE LA LONGUEUR DE CROISURE SUR LES CARACTERISTIQUES DE QUALITE DE LA SOIE GREGE DES COCONS POLYBIVOLTINS INDIENS

SUBHAS V. NAIK* & T. H. SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute (CSRTI), Central Silk Board, BTM Layout,
Madiwala, Bangalore — 560 068, Inde.

On a étudié l'influence de la cuisson des cocons et de la longueur de croisure sur certaines caractéristiques de qualité de la soie grège chez les cocons polybivoltins indiens. Nous avons réalisé l'étude en utilisant deux méthodes de cuisson dans une bassine unique et sous pression et avec trois niveaux de longueur de croisure — 3 cm, 8 cm et 13 cm. On observe que la condition de cuisson des cocons a une influence importante sur la qualité de la soie. La longueur de croisure a une influence importante sur la tension de dévidage et les caractéristiques de qualité de la soie grège, c'est à dire la netteté, la propreté, la ténacité et la cohésion. La cuisson dans une bassine unique et une longueur de croisure de 3 cm affectent la qualité de la soie grège. Alors que la longueur de la croisure augmente, on constate que la ténacité, la propreté et la cohésion de la soie grège augmentent considérablement. Les caractéristiques de qualité de la soie grège, c'est à dire la netteté, la propreté, la ténacité, l'allongement et la cohésion s'avèrent considérablement meilleures dans le cas de la cuisson pressurisée et avec une longueur de croisure de 8 et de 13 cm. Les résultats indiquent que la cuisson des cocons au niveau requis et le maintien d'une bonne longueur de croisure de 8 à 13 cm sont indispensables pour produire une soie de meilleure qualité.

INTRODUCTION

La croisure, le mécanisme pour entrelacer le filament de cocon sur lui-même dans une série de spirales pendant son passage de la bassine de dévidage au dévidoir est un des aspects importants du dévidage et sa longueur est l'un des paramètres importants du processus.

La longueur de croisure influence la cohésion et la ténacité de la soie grège. On suppose que la longueur de croisure nécessaire pour produire une soie de qualité dépend de la qualité du cocon et un passage approprié du fil est nécessaire pour introduire une meilleure longueur de croisure.

Il est indispensable de standardiser la longueur de croisure pour un passage donné du fil pour obtenir une meilleure qualité de soie grège. On a réalisé des études au Japon sur l'influence de la longueur de croisure sur les propriétés de la soie grège dans des bassines de dévidage automatiques associées avec une cuisson avec convoyeur chez les cocons hybrides bivoltins (Sumiza et coll., 1966, Arimoto, 1959, 1960). Des informations similaires sur l'influence de la variation des conditions et de la longueur de croisure avec une bassine de dévidage multibouts du CSRTI sont rares en particulier pour les cocons polybivoltins Indiens.

Cette étude se penche sur l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la longueur de croisure sur la performance de dévidage et sur les propriétés de la soie grège.

* Auteur auquel adresser la correspondance.

MATERIELS ET METHODES

Matière première :

On utilise des cocons polybivoltins (PM × NB4D2) obtenus auprès des Marchés aux Cocons du gouvernement.

Conception expérimentale :

On réalise l'étude en variant deux facteurs c'est à dire **les méthodes de cuisson des cocons (facteur A, 2 niveaux) et la longueur de croisure (facteur B, 3 niveaux)** en conservant les autres paramètres constants.

Séchage des cocons :

On sèche les cocons à l'air chaud dans un séchoir par lots en suivant un profil de température de 115° C à 55° C pendant quatre heures et demi.

Cuisson des cocons :

On utilise deux conditions de cuisson des cocons (méthode de cuisson à la bassine ouverte et pressurisée) pour varier le degré de cuisson des cocons.

Avec la méthode de cuisson à la bassine ouverte, en utilisant une bassine unique, on cuit les cocons à 95° C pendant 2 minutes.

On procède à la cuisson pressurisée en utilisant une machine de cuisson circulaire pressurisée du CSTRI en employant les paramètres de cuisson suivants.

1. Température et durée de rouissage	70° C	45 secondes
2. Traitement et durée à température élevée à la vapeur	90° C	30 secondes
3. Traitement et durée d'imprégnation dans l'eau à basse température	75° C	45 secondes
4. Température et durée de cuisson	95° C	30 secondes
5. Température et durée d'ajustement	95° C à 75 ° C	240 secondes

Purgeage :

On purge les cocons cuits dans de l'eau à 80° C.

Dévidage :

On dévide les cocons sur une machine de dévidage multibouts du CSRTI en utilisant trois niveaux de longueur de croisure, c'est à dire 3 cms, 8 cms et 13 cms. Pour la croisure, on introduit 12 tours / cm dans tous les cas. On conserve les autres paramètres de dévidage constants.

Vitesse de dévidage	100 m / min
Température de l'eau de la bassine	40° C
Passe-fil du CSTRI avec	diamètre du trou de 250 microns

Imprégnation des roquets:

On trempe les roquets dans l'eau en utilisant une chambre d'imprégnation à vide pour petit dévidoir du CSTRI avec une pression de vide de 300 mm Hg. On répète le cycle trois fois.

Reflottage :

On reflotte la soie grège en utilisant une machine de reflottage de type fermé du CSTRI avec une vitesse de reflottage de 225 tpm, une température de 40° C et une HR de 45 %.

Qualité de l'eau :

On utilise de l'eau avec un pH de 7,1, une dureté de 70 ppm et une alcalinité de 80 ppm.

Test de la soie grège :

On teste les caractéristiques de propreté, de netteté et de basse netteté des échantillons de soie grège en utilisant un testeur Scriplane et les caractères de cohésion en utilisant un testeur de cohésion Duplan en adoptant la procédure de l'AIS. De plus, on teste la ténacité et l'allongement de la soie grège en utilisant un testeur de rupture Instron en suivant la procédure habituelle.

Analyse statistique :

On analyse statistiquement les données recueillies en utilisant l'analyse de variance à deux facteurs.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats moyens sur l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la longueur de croisure sur les caractéristiques de la soie grège des cocons polybivoltins sont présentés dans les Tableaux I et II. L'analyse de variance pour les caractéristiques de la soie grège est présentée dans le Tableau III.

Netteté et faible netteté de la soie grège :

Les résultats donnés dans le Tableau I indiquent que la méthode de cuisson des cocons a une influence importante sur la netteté et sur la faible netteté de la soie grège. L'influence de la méthode de cuisson du cocon sur la netteté et la faible netteté de la soie grège est importante au seuil de 1 %, tandis que l'influence de la longueur de croisure sur la netteté de la soie grège est importante au seuil de 5 % (Tableau III). On attribue l'amélioration importante de la netteté et de la faible netteté avec la méthode de cuisson pressurisée au gonflement meilleur et uniforme et au ramollissement de la séricine dans toutes les couches de la coque soyeuse.

Propreté de la soie grège :

Le Tableau I montre que la méthode de cuisson du cocon et la longueur de croisure ont toutes les deux une influence importante sur la propreté de la soie grège. L'influence de la méthode de cuisson du cocon est importante au seuil de 1 % tandis que l'influence de la longueur de croisure sur la propreté de la soie grège est importante au seuil de 5 % (Tableau III).

On observe qu'alors que la longueur de la croisure augmente de 3 cm à 13 cms, la propreté de la soie grège augmente considérablement. Cela est probablement dû à la disparition des défauts de propreté (comme les bouts mous et les déchets) avec une croisure plus longue pendant le dévidage. On observe pendant le dévidage que, lorsqu'il se produit des défauts de propreté dans le fil et qu'il passe par une longueur de croisure de 8 cm et de 13 cm, un mouvement individuel d'arrêt du dévidage se produit ou il y a une rupture du fil avec la tension de croisure en raison de la plus grande longueur de croisure. Mais on n'observe pas ce phénomène quand la longueur de croisure est de 3 cms.

Les valeurs DC (Tableau I) montrent que les différences dans le caractère de propreté de la soie grège entre 3 cm, 8 cm et 13 cm de longueur de croisure sont importantes au seuil de 5 %. Les résultats indiquent qu'une longueur de croisure plus importante permet d'améliorer considérablement la qualité de la soie grège. La méthode de cuisson pressurisée donne une propreté de la soie grège considérablement améliorée par rapport à la méthode de cuisson à la bassine ouverte. On attribue cela

au meilleur gonflement et amollissement de la séricine aux points de croisement du filament dans la coque soyeuse avec la méthode de cuisson pressurisée.

Résistance de la soie grège :

Les résultats présentés dans le Tableau II montrent que la résistance de la soie grège augmente avec l'augmentation de la longueur de la croisure. La méthode de cuisson pressurisée et la longueur de croisure de 13 cm donnent une meilleure résistance de la soie grège par comparaison aux autres conditions.

Les résultats de l'analyse de variance (Tableau III) indiquent que la méthode de cuisson du cocon et la longueur de croisure ont une influence importante sur la ténacité de la soie grège au seuil de 1 %. On observe d'après les valeurs DC (Tableau II) que les différences de ténacité de la soie grège entre une longueur de croisure de 3cm, 8cm et 13cm sont significatives au seuil de 5 %.

On attribue l'augmentation de la résistance avec l'augmentation de la longueur de croisure à l'augmentation de la tension de dévidage alors que la longueur de croisure augmente (Tableau II). L'augmentation de la tension de dévidage pourrait entraîner une meilleure orientation des fibrilles dans la fibroïne du filament de cocon en entraînant une augmentation de la ténacité de la soie grège. On doit noter que la soie grège devient plus compacte et circulaire alors que la longueur de croisure augmente (Arimoto, 1959, 1960). L'augmentation de la ténacité pourrait aussi être due au fait qu'alors que la longueur de croisure augmente, la force d'agglutination entre les filaments augmente et le fil devient plus compact et plus fort.

La méthode de cuisson pressurisée donne une résistance considérablement meilleure de la soie grège par comparaison à la méthode de cuisson dans une bassine ouverte (Tableau II). On peut attribuer cela aux meilleurs gonflement et amollissement des points de croisement du filament de séricine dans les cocons avec la méthode de cuisson pressurisée par comparaison à la sous / mauvaise cuisson des cocons avec la méthode ouverte à la bassine. Cela pourrait aussi être attribué au fait que la dissolution de la séricine avec la méthode de cuisson pressurisée est plus importante par comparaison à la méthode de cuisson à la bassine ouverte, ce qui entraîne une diminution du titre et donc une augmentation de la résistance de la soie grège avec la méthode de cuisson pressurisée.

Allongement de la soie grège :

Les résultats de l'analyse de variance (Tableau III) indiquent que l'influence de la longueur de la croisure sur l'allongement de la soie grège n'est pas significative. Cependant, il y a une légère baisse de l'allongement de la soie grège alors que la longueur de la croisure augmente (Tableau II). Cela pourrait être dû à la tension de dévidage alors que la longueur de croisure augmente. Cependant, on observe que l'allongement de la soie grège est bon avec les trois niveaux de longueur de croisure, c'est à dire 3 cms, 8cms et 13 cms. Les résultats indiquent que le maintien d'une bonne longueur de croisure pendant le dévidage ne gêne pas l'obtention d'un bon allongement de la soie grège.

La méthode de cuisson pressurisée donne un allongement considérablement meilleur de la soie grège par comparaison à celui obtenu avec la méthode de cuisson à la bassine ouverte (Tableau II). On peut attribuer cela aux meilleurs gonflement et amollissement des points de croisement du filament de cocon de séricine et dans toutes les couches de la coque soyeuse. On peut attribuer la baisse significative de l'allongement de la soie grège avec la méthode de cuisson ouverte dans une bassine à la sous-cuisson des cocons. La sous-cuisson des cocons augmente la tension d'exfoliation, qui à son tour augmente la tension de dévidage totale (Takabayashi et coll., 1995). Une tension de dévidage plus élevée semble avoir un effet sur l'allongement de la soie grège.

Cohésion de la soie grège :

Les résultats présentés dans la Figure 1 et le Tableau III montrent que la méthode de cuisson des cocons et la longueur de croisure ont une influence considérable (au seuil de 1 %) sur la cohésion de la soie grège. Alors que la longueur de croisure augmente, il s'avère que la cohésion de la soie grège

augmente considérablement (Figure 1). La cohésion de la soie grège avec une longueur de croisure de 3cm associée à une méthode de cuisson ouverte à la bassine est très mauvaise tandis qu'une longueur de croisure de 13 cms en association avec une méthode de cuisson pressurisée donne une cohésion maximum de la soie grège. Les valeurs DC (Tableau II) indiquent que les différences de cohésion de la soie grège entre une longueur de croisure de 3cms, 8 cms et 13 cms sont significatives au seuil de 5 %.

L'augmentation de la cohésion de la soie grège avec l'augmentation de la longueur de croisure est due au fait que quand les filaments des cocons cuits passent par une croisure d'une bonne longueur pendant le dévidage, l'agglutination nécessaire des filaments de soie grège se produit (en raison d'une force de liaison suffisante exercée par la croisure) et cela entraîne une bonne cohésion de la soie grège. On doit noter qu'à l'endroit des parties enroulées (croisure), il se produit une friction entre les deux fils alors qu'ils bougent ensemble dans la même direction dans le passage. Cela contribue à augmenter l'agglutination entre les filaments de cocons et donc la cohésion de la soie grège.

Fusahichi Nakagawa (Takashi Omura, 1981) a développé une relation entre la tension dans le fil avant le passage par la croisure et la tension dans le fil après que le fil soit passé par la croisure pendant le dévidage.

$$T = T_0 \frac{\sin \delta}{\sin \theta} \times \frac{\sin \beta}{\sin \alpha} - b \frac{\sin \beta}{\sin \alpha}$$

On observe que la méthode de cuisson pressurisée donne une cohésion considérablement meilleure de la soie grège par comparaison à la méthode de cuisson à la bassine ouverte (Figure 1). Cela est dû aux meilleurs gonflement et amollissement de la séricine des couches du cocon dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée grâce à la cuisson efficace des cocons. Il faut noter qu'il ne se produira une agglutination correcte des filaments dans le fil de soie grège que lorsque la séricine des couches du filament de cocon se ramollit correctement (Subhas, 1995). On attribue la diminution de la cohésion de la soie grège avec la méthode de cuisson à la bassine ouverte au sous / mauvais amollissement de la séricine. Les résultats indiquent que la cuisson des cocons au niveau requis et le maintien d'une bonne longueur de croisure sont essentiels pour obtenir une bonne cohésion de la soie grège.

CONCLUSION

La longueur de croisure a une influence importante sur certaines caractéristiques de qualité de la soie grège tandis que la condition (méthode) de cuisson des cocons influence considérablement à la fois le dévidage et les caractéristiques de qualité de la soie grège. Pour obtenir une soie grège avec de bonnes caractéristiques de cohésion, de ténacité et de propreté, une cuisson efficace des cocons et l'utilisation d'une bonne longueur de croisure au cours du processus de dévidage sont indispensables.

RAPID CLONAL PROPAGATION OF MULBERRY VARIETY – S54 THROUGH *IN VITRO* CULTURE OF AXILLARY BUD

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

Plant Biotechnology Unit, Annexe-Department of Botany, Bangalore University,
Bangalore – 560 056, India.

In vitro multiple shoots were obtained from *in vivo* non-embryogenic vegetative propagule axillary buds excised from ten years old mature tree of mulberry variety – S54 of *Morus indica* L. during winter, when cultured on LSBM supplemented BAP (2 mg l^{-1}) and TIBA (1 mg l^{-1}) with 90% initiation response. The repeated subculture resulted in rapid shoot multiplication at the average rate of 3-fold per subculture. The *in vitro* raised well developed elongated healthy multiple shoots were rooted *ex vitro* on horticultural grade soilrite mix-peat:perlite:vermiculite (1:1:1 v/v) with half strength MS salts fortified with NAA (1 mg l^{-1}). The regenerated complete plantlets were successfully established in soil under field conditions with 92% survival frequency after a few days of indoor acclimatization. The statistical data pertaining to multiple shoot and root formation revealed significant difference between and within the treatments.

Keywords: Clonal propagation, axillary bud, multiple shoots, *ex vitro* rooting, survival frequency.

Abbreviations :	LSBM	- Linsmaier and Skoog's Basal Medium
	BAP	- 6-Benzyl Amino Purine
	TIBA	- 2,3,5-Tri Iodo Benzoic Acid
	NAA	- α -Naphthalene Acetic Acid
	IAA	- Indole Acetic Acid
	IBA	- Indole Butyric Acid

INTRODUCTION

Mulberry is a rapid growing perennial woody plant of well known economic importance in silk industry. The quantitative and qualitative improvement of mulberry varieties plays a vital role in the progress of sericulture industry (Tewary *et al.*, 1997). However, mulberry improvement programmes have been hampered due to long life cycle, prolonged juvenile period, heterozygosity, polyploidy and extensive outbreeding (Kavyashree, *et al.*, 2002). Further, the dioecious nature of some important varieties of the taxon and the genetic linkage of desirable and weak traits limit the genetic improvement through conventional hybridization techniques (Tewary *et al.*, 1997). Several attempts have been made during the last three decades to utilize tissue culture techniques for micropropagation and regeneration using non-embryogenic vegetative propagules of different varieties of mulberry to overcome such constraints (Ohyama, 1970; Ghugale *et al.*, 1971; Oka and Ohyama, 1986; Ohyama

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

and Oka, 1987; Kim *et al.*, 1985; Jain *et al.*, 1990; Hossain *et al.*, 1992; Pattnaik and Chand, 1997; Tewary and Oka, 1999; Srinivasa *et al.*, 2001). However, there is no report on *in vitro* culture of mulberry variety – S54. Keeping this in view, here we report a repeatable *in vitro* protocol for rapid rate of clonal multiplication to obtain large number of genetically identical plants using *in vivo* axillary bud of mulberry variety- S54 to be made available to the farmers for commercial exploitation.

MATERIAL AND METHODS

Explant source:

Mulberry belongs to the genus *Morus* of the family Moraceae, the biggest family in the order Urticales. The mulberry variety-S54, a popular beneficial mutant evolved from Berhampore local through mutation breeding grown upto 4-6 meters as a tree, but commercially grown in the form of a bush, was used as source material collected from the mulberry germplasm bank, Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore. Developing juvenile twigs of winter sprouts were collected from a ten years old female mature tree of mulberry variety-S54. After trimming of the larger leaves, the material was cut into pieces measuring about 1.0-1.5 cm each containing a single axillary bud.

Surface sterilization:

The non-embryogenic vegetative propagule axillary bud was washed thoroughly in tap water, surface sterilized using liquid detergent Labolene – 5% (v/v), given a rinse in 70% ethanol for 30 seconds, disinfected in 0.1% mercuric chloride (HgCl₂) for 3 minutes and rinsed several times in sterile water to remove the traces of mercuric chloride (HgCl₂).

Culture medium:

The sterilized axillary buds were cultured on LSBM fortified with BAP and TIBA in different concentrations ranging from 1.0-2.5 mg l⁻¹ and 0.5-2.0 mg l⁻¹ respectively to study their response on axillary bud multiplication potential (Table I).

Culture conditions:

The culture bottles were closed with plastic caps and sealed with klin wrap and were maintained in the culture room at a temperature 25 ± 2° C under built-in white fluorescent light at a photon flux density of 30-50 µEm⁻²s⁻¹ under a photoperiodic regime of 16 hours light and 8 hours dark.

Multiplication of shoots:

The shoots formed *in vitro* were isolated and sectioned into a single axillary bud after removing the leaves. The segments of axillary buds were subcultured for further multiplication. After multiplication, clumps of multiple shoots were subcultured repeatedly for rapid rate of clonal multiplication.

Ex vitro rooting:

The well developed clump of multiple shoots were transferred to culture bottles containing horticultural grade soilrite mix - peat:perlite:vermiculate (1:1:1 v/v) with half strength MS salts supplemented with different concentrations of auxin NAA, IAA and IBA ranging from 0.5-2.0 mg l⁻¹ (Table II) to study their effect on profuse *ex vitro* rooting. The culture bottles with loose lids were maintained in a culture room. After 15 days, loosely covered caps were removed and plants were exposed to less humid conditions for the development of cuticle and epicuticular wax.

Statistical analysis:

The experimental data of the present investigation was analysed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the variation between and within the treatments with respect to the number of shoots and roots (Table I & II). For each treatment 10 replicates were used and each experiment was repeated thrice. Further, post-hoc test was also conducted to know which treatment is different from each other.

Acclimatization and transfer of plantlets to soil:

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 (3:1 v/v) without any adjuvants for profuse rooting and simultaneous acclimatization. The acclimatized complete plantlets were transferred to the field and their survival frequency was calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

Response of explant:

The morphogenetic response of the non-embryogenic vegetative juvenile propagule axillary buds (Fig. 1) to various concentrations of cytokinin and auxin are documented in Table I. In the present study it was observed that two or three changes of media during the first week of culture was found to be necessary to avoid exudation of milky latex-like substances from the *in vivo* axillary bud to obtain satisfactory response. This coincides with the findings of Islam *et al.*, (1993) who have reported that two or three changes of media is beneficial for better *in vitro* response of the juvenile explants in *Morus laevigata*. Further, the actively growing juvenile propagule has been selected as explant from the mature field grown plant of mulberry in the present study because it is more responsive than the mature tissue. This agrees with the findings of Bonga (1987) who has reported *in vitro* clonal propagation become easy when they are from the juvenile parts of tree species.

Initiation of shoots:

After 15 days of culture, the explants showed their first response by enlargement and break of axillary bud (Fig. 2). Similar response was observed by Hossain *et al.*, (1992) in *Morus laevigata*. The shoot initiation with one leaf (Fig. 3) was observed on all the concentrations of growth regulators studied with varying percentage of response (38-90%) after 21 days of culture. The highest 90% response was observed with the increase of cytokinin BAP and auxin TIBA upto 2 mg l⁻¹ and 1 mg l⁻¹ respectively on LSBM. But further increase of the BAP and TIBA level suppressed the shoot initiation (Table I). However, the present study clearly indicates that the efficiency of cytokinin BAP on shoot initiation was not improved when it was supplemented alone. This agrees with the findings of Chattopadhyay *et al.*, (1990) who have reported that auxin and cytokinin combination is necessary for shoot initiation in mulberry.

Multiplication of shoots:

The axillary buds were sectioned from the shoots formed *in vitro* and subcultured on the same medium to obtain multiple shoots. After 10 days of subculture, multiple shoots were obtained in all the treatments tried, but more number of 8-10 multiple shoots (Fig. 4) were observed on LSBM fortified with BAP (2 mg l⁻¹) and TIBA (1 mg l⁻¹). This enhancement in the rate of multiplication is due to synergistic effect of cytokinin and auxin ratio in the medium. Similar observation was made by Sugimura *et al.*, (1998) who have suggested that to achieve high frequency of shoot multiplication it is necessary to supplement cytokinin and auxin to the culture medium.

The multiple shoots were subcultured for 4-5 passages to obtain a clump of healthy, elongated and robust 30-35 multiple shoots (Fig. 5) on the same medium. It was observed that the repeated subculture resulted in rapid shoot multiplication at the average rate of 3-fold per subculture. Similar results have been reported by Hossain *et al.*, (1992) in *Morus laevigata*. Further, multiplication and

elongation of shoots increased during the first 4 subcultures, after which there was a gradual decline in multiplication rate. A similar phenomenon was also observed in mulberry by Pattnaik *et al.* (1996).

Table I. Effect of different concentrations of growth regulators on initiation and multiplication of shoots from axillary bud explants of mulberry variety-S54 (*Morus indica* L.).

Tableau I. Effet de différentes concentrations de régulateurs de croissance sur le commencement et la multiplication de pousses à partir d'explants de bourgeons axillaires chez la variété de mûrier S54 (Morus indica L.).

Basal Media	BAP	TIBA	Response	No. of shoots/explant
Milieu de base	(mg l ⁻¹)	(mg l ⁻¹)	Réponse (%)	Nbre de pousses / explant $\bar{X} \pm \text{SD}$
LS	1.0	0	38	1.328 ± 0.17
LS	1.5	0	42	1.364 ± 0.19
LS	2.0	0	46	1.4 ± 0.19
LS	2.5	0	50	1.566 ± 0.22
LS	1.0	0.5	42	1.53 ± 0.24
LS	1.5	0.5	48	1.631 ± 0.20
LS	2.0	0.5	60	1.992 ± 0.17
LS	2.5	0.5	58	1.808 ± 0.18
LS	1.0	1.0	62	2.017 ± 0.17
LS	1.5	1.0	70	2.228 ± 0.15
LS	2.0	1.0	90	3.119 ± 0.24
LS	2.5	1.0	78	2.337 ± 0.18
LS	1.0	1.5	42	1.429 ± 0.24
LS	1.5	1.5	48	1.559 ± 0.27
LS	2.0	1.5	60	1.992 ± 0.17
LS	2.5	1.5	54	1.696 ± 0.15
LS	1.0	2.0	46	1.501 ± 0.21
LS	1.5	2.0	44	1.494 ± 0.26
LS	2.0	2.0	52	1.566 ± 0.22
LS	2.5	2.0	42	1.429 ± 0.24

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

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

SV	DF	SS	MSS	F _{cal} ratio	F _{tab} value**	CD
Treatment / Traitements	19	36	1.89	44.99	1.59	0.3006
Error / Ecart	180	8	0.04			
Total	199	43				

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

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

Table II. Effect of different auxins on *ex vitro* rooting of *in vitro* raised plants derived from axillary bud of mulberry variety-S54 (*Morus indica* L.).

Tableau II. Effet de différentes auxines sur le racinement *ex vitro* de plants cultivés *in vitro* dérivés de bourgeons axillaires de la variété de mûrier S54 (*Morus indica* L.).

Soilrite mix (v/v)	Basal media	Concentration of auxin	Response (%)	No. of roots/explant
<i>Mélange de sol (v/v)</i>	<i>Milieu de base</i>	<i>Concentration de l'auxine (mg l⁻¹)</i>	<i>Réponse (%)</i>	<i>Nbre de racines / explant</i> $\bar{X} \pm \text{SD}$
Peat :	½ MS	NAA	0.5	2.74 ± 0.28
Perlite :			1.0	3.917 ± 0.24
Vermiculat			1.5	3.092 ± 0.22
<i>Tourbe :</i>			2.0	2.517 ± 0.29
<i>Perlite :</i>				
<i>Vermiculat</i> (1 : 1 : 1)				
Peat :	½ MS	IAA	0.5	2.194 ± 0.30
Perlite :			1.0	2.619 ± 0.21
Vermiculat			1.5	3.058 ± 0.23
<i>Tourbe :</i>			2.0	2.714 ± 0.22
<i>Perlite :</i>				
<i>Vermiculat</i> (1 : 1 : 1)				
Peat :	½ MS	IBA	0.5	2.286 ± 0.29
Perlite :			1.0	3.325 ± 0.21
Vermiculat			1.5	2.757 ± 0.33
<i>Tourbe :</i>			2.0	2.374 ± 0.28
<i>Perlite :</i>				
<i>Vermiculat</i> (1 : 1 : 1)				

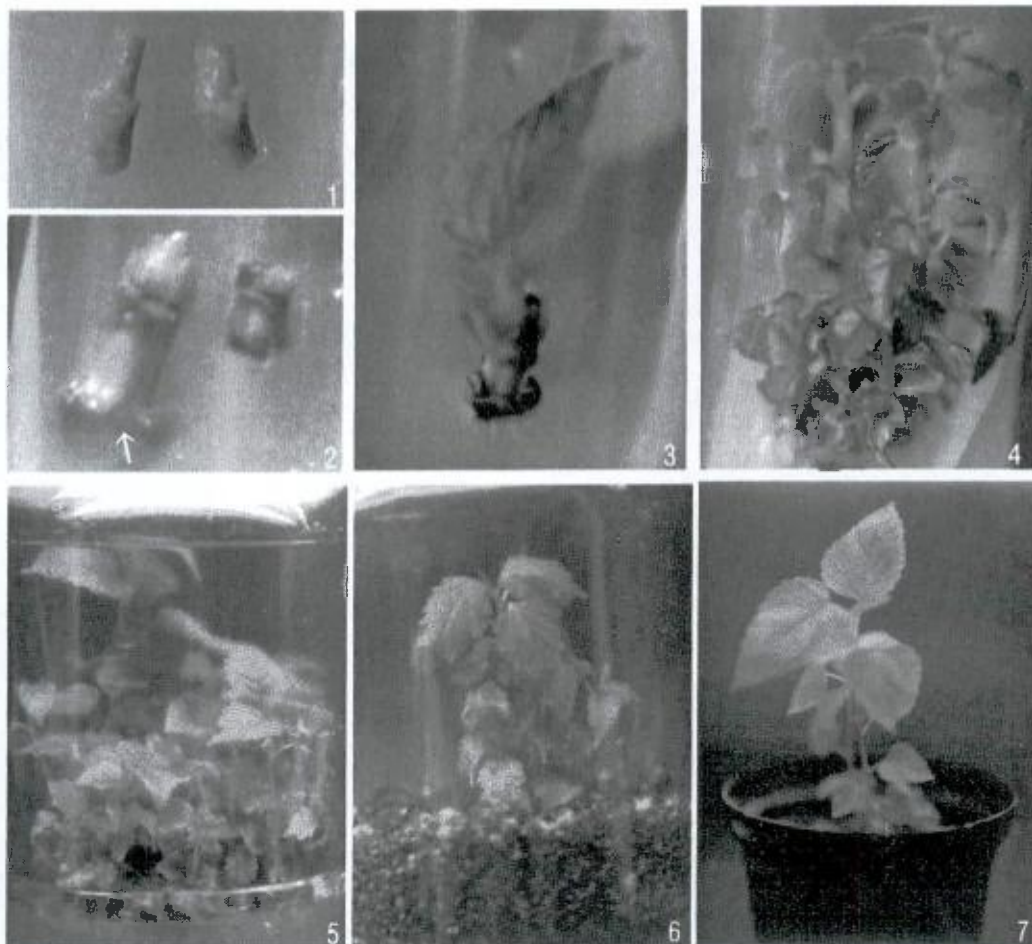
ANOVA Table (for no. of roots/explant).

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

SV	DF	SS	MSS	F _{cal} ratio	F _{tab} value**	CD
Treatments / Traitements	11	26	2.37	34.63	1.59	0.376
Error / Ecart	108	7	0.07			
Total	119	34				

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

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



***In vitro* micropropagation of axillary bud of mulberry variety S54 (*Morus indica* L.).**

Micro-multiplication in vitro du bourgeon axillaire de la variété de mûrier S54 (*Morus indica* L.).

Fig. 1. Axillary bud explant at culture.

Fig. 1. Explant de bourgeon axillaire en culture.

Fig. 2. Enlargement and break of axillary bud.

Fig. 2. Agrandissement et rupture du bourgeon axillaire.

Fig. 3. Shoot initiation with one leaf after 21 days of culture.

Fig. 3. Début de pousse avec une feuille au bout de 21 jours de culture.

Fig. 4. Multiple shoots after 10 days of subculture.

Fig. 4. Pousses multiples au bout de 10 jours de sous-culture.

Fig. 5. Healthy, elongated and robust multiple shoots.

Fig. 5. Pousses multiples, saines, allongées et robustes.

Fig. 6. *Ex vitro* rooting of multiple shoots.

Fig. 6. Racinement ex vitro de pousses multiples.

Fig. 7. Acclimatized complete plantlets ready for transfer to field.

Fig. 7. Plants complets acclimatés prêts pour le transfert sur le terrain.

***Ex vitro* rooting:**

Ex vitro rooting of multiple shoots was achieved on horticultural grade soilrite mix containing half strength MS salts with NAA (1 mg l^{-1}) (Fig. 6). This is in contrast with the findings of Katase (1994) who has used vermiculate moistened with 0.5 mg l^{-1} hyponex for *ex vitro* rooting in mulberry cultivar Mitsushigeri. It was noticed in the present study that NAA (1 mg l^{-1}) is the best auxin for induction and profuse rooting (14-16) of multiple shoots *ex vitro* when compared to other auxins IAA (8-10) and IBA (9-11) tried. Further, the rooted plants were acclimatized using tissue culture grade soilrite mix without any adjuvants (Fig. 7). This technique eliminates a step of *in vitro* rooting thereby reducing the overall cost of the micropropagated plants. Further, production of plantlets with profuse rooting *ex vitro* is more important for transferring regenerants to soil. The *ex vitro* rooted 6,561 plants were established in soil with 90% (5,904 plants) survival frequency.

Statistical analysis:

The statistical analysis of the experimental data revealed that there exists a highly significant difference between and within the treatments. The highest mean number of shoots per explant 3.119 was observed on LSBM fortified with BAP (2 mg l^{-1}) and TIBA (1 mg l^{-1}) and the lowest mean number 1.328 was observed on LSBM fortified with BAP (1 mg l^{-1}) alone (Table I). Further, the highest mean number of roots per explant 3.917 was observed on soilrite mix containing half strength MS salts with NAA (1 mg l^{-1}) and the lowest mean number 2.194 was observed on soilrite mix containing half strength MS salts with IAA (0.5 mg l^{-1}) (Table II). The analysis of the data pertaining to post-hoc test revealed that of the 190 and 66 pairs of treatments 98 and 38 pairs differed significantly with regard to number of shoots and roots respectively.

CONCLUSION

From the foregoing results and discussion, it can be concluded that the mulberry explants through *in vitro* culture can readily be regenerated in large scale. Further, because of cross pollination, heterozygosity prevails among the mulberry species and hence propagation through seeds does not conserve true-to-typeness. Therefore, the present investigation was undertaken with the main objective of obtaining genetically similar true-to-type clones. This technique can be adopted for rapid clonal propagation in other mulberry varieties.

ACKNOWLEDGEMENT

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

REFERENCES

- BONGA J.M. (1987) Clonal propagation of mature trees: Problems and possible solutions. Cell and Tissue Culture in Forestry, In: Bonga J.M., Durzan D.J. (eds), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 249-271.
- CHATTOPADHYAY S., SOUMITRA CHATTOPADHYAY & DATTA R.K. (1990) Quick *in vitro* production of mulberry (*Morus alba*) plantlets for commercial purposes. Indian J. Exp. Biol., 28: 522-525.
- GHUGALE D.D., KULKARNI D. & NARASIMHAN R. (1971) Clonal propagation of *Morus alba*. Indian J. Exp. Biol., 9: 381-384
- HOSSAIN M., RAHMAN S.M., ZAMAN A., JOARDER O.I. & ISLAM R. (1992) Micropropagation of *Morus laevigata* Wall. from mature trees. Plant Cell Rep. 11: 522-524.
- ISLAM R., ZAMAN A., JOARDER O.I. & BARMAN A.C. (1993) *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* Wall. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 33: 339-341.
- JAIN A.K., DANDIN S.B. & SENGUPTA K. (1990) *In vitro* propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant Cell Rep., 8: 737-740.
- 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. & REVANASIDDIAIAH H.M. (2002) Induction of haploid plants in mulberry variety-S₅₄ (*Morus indica* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. Sericologia, 42(4): 551-559.
- KIM H.R., PATEL K.R. & THORPE T.A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot. Gaz., 146: 335-340.
- OHYAMA K. (1970) Tissue culture in mulberry tree. JARQ, 5(1): 30-34.
- OHYAMA K. & OKA S. (1987) Mulberry. In: Cell and Tissue Culture in Forestry, Bonga J.N., Durjan D.J. (eds), Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands, pp. 272-284
- OKA S. & OHYAMA K. (1986) Mulberry (*Morus alba* L.). In: Biotechnology in agriculture and forestry, Bajaj Y.P.S. (ed), Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin, pp. 384-392
- PATTNAIK S.K. & CHAND P.K. (1997) Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *Morus ihou* Koidz. and *Morus serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. Plant Cell Rep., 16: 503-508.
- PATTNAIK S.K., SAHOO Y. & CHAND P.K. (1996) Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. Syn. *Morus acidosa* Griff. Plant Cell Rep., 15(11): 841-845.
- 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.
- SUGIMURA Y., ADACHI T., KOTANI E. & FURUSAWA T. (1998) Shoot bud formation and plantlet regeneration from the basal tissues of mulberry leaves. J. Seric. Sci. Jpn., 67(5): 421-424.

- TEWARY P.K. & OKA S. (1999) Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 59: 223-226.
- TEWARY P.K., VENKATESWARLU M., RAGHUNATH M.K. & SARKAR A. (1997) In: Applications of tissue culture technique in mulberry (*Morus* spp.) propagation and breeding. *Biotechnological applications of plant tissue and cell culture*, Ravishankar G.A., Venkataraman L.V. (eds), Oxford and IBH publishing Co Pvt Ltd, New Delhi, Calcutta, pp. 28-39.

MULTIPLICATION CLONALE RAPIDE DE LA VARIÉTÉ DE MURIER S54 PAR CULTURE *IN VITRO* DE BOURGEON AXILLAIRE

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

Plant Biotechnology Unit, Annexe – Department of Botany, Bangalore University,
Bangalore – 560 056, Inde.

On obtient des pousses multiples in vitro à partir du propagule végétatif non embryogénique in vivo de bourgeons axillaires excisé sur un arbre de dix ans de la variété de mûrier – S54 de Morus indica L. en hiver, quand on le cultive sur du LSBM additionné de BAP (2 mg l⁻¹) et de TIBA (1 mg l⁻¹) avec une réponse d'initiation de 90 %. La sous-culture répétée entraîne une multiplication rapide des pousses au taux moyen de trois fois par sous-culture. Les pousses multiples saines allongées bien développées in vitro racinent ex vitro sur un mélange de sol pour l'horticulture tourbe : perlite : vermiculite (1 : 1 : 1 v/v) avec des sels MS à demi concentrés fortifiés avec du NAA (1 mg l⁻¹). Les plants complets régénérés s'établissent dans le sol avec succès sur le terrain avec une fréquence de survie de 92 % après quelques jours d'acclimatation à l'intérieur. Les données statistiques de la multiplication des pousses et de la formation des racines révèlent une différence importante entre et à l'intérieur des traitements.

Abréviations :	LSBM	- Milieu de base de Linsmaier et Skoog
	BAP	- Purine Amino Benzyl-6
	TIB	- Acide benzoïque 2, 3,5- tri Iodo
	NAA	- Acide acétique α -naphthalène
	IAA	- Acide acétique indole
	IBA	- Acide butyrique indole

INTRODUCTION

Le mûrier est une plante ligneuse pérenne poussant rapidement, d'une importance économique notoire pour l'industrie de la soie. L'amélioration quantitative et qualitative des variétés de mûrier joue un rôle vital dans le progrès de l'industrie séricicole (Tewary et coll., 1997). Cependant, les programmes d'amélioration du mûrier ont été entravés à cause de la longueur de son cycle de vie, du prolongement de sa période juvénile, de son hétérozygotie, de sa polyploidie et de son outbreeding extensif (Kavyashree et coll., 2002). De plus, la nature dioïque de certaines variétés importantes du taxon et la liaison génétique des caractères désirables et faibles limitent l'amélioration génétique par les techniques d'hybridation conventionnelles (Tewary et coll., 1997). On a procédé à plusieurs essais au cours des trois dernières décennies pour utiliser des techniques de culture de tissus pour la micro-multiplication et la régénération en utilisant des propagules végétatifs non embryogéniques de

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

différentes variétés de mûrier pour surmonter de telles contraintes (Ohyama, 1970 ; Ghugale et coll., 1971 ; Oka et Ohyama, 1986 ; Ohyama et Oka, 1987 ; Kim et coll., 1985 ; Jain et coll., 1990 ; Hossain et coll., 1992 ; Pattnaik et Chand, 1997 ; Tewary et Oka, 1999, Srinivasa et coll., 2001). Cependant, il n'y a pas de rapport sur la culture *in vitro* de la variété de mûrier – S54. Dans ce contexte, nous faisons part ici d'un protocole *in vitro* reproductible pour un taux rapide de multiplication clonale pour obtenir un grand nombre de plants génétiquement identiques en utilisant un bourgeon axillaire *in vivo* de la variété de mûrier S54 pour les rendre disponibles pour les fermiers pour l'exploitation commerciale.

MATERIELS ET METHODES

Source de l'explant :

Le mûrier appartient au genre *Morus* de la famille des Moraceae, la plus importante famille de l'ordre des Urticales. La variété de mûrier S54, un mutant populaire bénéfique mis en place à partir de Berhampore local par un breeding de mutation poussant jusqu'à 4 à 6 mètres comme arbre, mais cultivé commercialement sous la forme de buisson, est utilisé comme matériau source recueilli dans la banque génétique des mûriers, du Département de Sericulture, à l'Université de Bangalore, à Bangalore. On recueille les rameaux juvéniles en développement provenant de rejets hivernaux d'un arbre femelle de dix ans de la variété de mûrier S54. Après la taille des feuilles les plus grandes, on coupe le matériau en morceaux de 1 à 1,5 cm chacun contenant un bourgeon axillaire unique.

Sterilisation de la surface :

On lave soigneusement le bourgeon axillaire du propagule végétatif non embryogénique à l'eau du robinet, on stérilise la surface en utilisant un détergent liquide, le Labolène à 5 % (v/v), on le rince dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes, on le désinfecte dans du chlorure mercurique à 0,1 % (HgCl₂) pendant 3 minutes et on le rince plusieurs fois dans de l'eau stérile pour enlever les traces de chlorure mercurique (HgCl₂).

Milieu de culture :

Les bourgeons axillaires stérilisés sont cultivés sur du LSBM fortifié avec du BAP et du TIBA à différentes concentrations comprises entre 1 et 2,5 mg l⁻¹ et 0,5 et 2 mg l⁻¹ respectivement pour étudier leur réponse sur le potentiel de multiplication du bourgeon axillaire (Tableau I).

Conditions de culture :

On ferme les bouteilles de culture avec des bouchons en plastique, on les rend hermétiques avec du film plastique et on les maintient dans la pièce de culture à une température de 25 ± 2° C sous une lumière fluorescente blanche avec une densité de flux de photon de 30-50 µEm⁻² s⁻¹ sous un régime photopériodique de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité.

Multiplication des pousses :

On isole les pousses formées *in vitro* et on les sectionne en bourgeon axillaire unique après avoir retiré les feuilles. On place les segments des bourgeons axillaires en sous-culture pour une multiplication ultérieure. Après la multiplication, on place les masses de pousses multiples en sous-culture de manière répétée pour un taux rapide de multiplication clonale.

Racinement *ex vitro* :

On transfère la masse bien développée des pousses multiples dans des bouteilles de culture contenant un mélange de sol pour l'horticulture tourbe : perlite : vermiculat (1 / 1 / 1 v/v) avec des sels MS à moitié concentrés additionnés avec différentes concentrations d'auxines, NAA, IAA et IBA comprises entre 0,5 et 2 mg l⁻¹ (Tableau II) pour étudier leur effet sur un racinement abondant *ex vitro*.

On laisse les bouteilles de culture avec des couvercles à moitié refermés dans une pièce de culture. Au bout de 15 jours, on retire les couvercles vissés lâchement et on expose les plants à des conditions moins humides pour le développement de la cuticule et de la cire épicutulaire.

Analyse statistique :

On analyse les données expérimentales de l'étude avec une analyse de variance à un facteur (ANOVA) pour déterminer la variation entre et à l'intérieur des traitements par rapport au nombre de pousses et de racines (Tableau I et II). Pour chaque traitement, on utilise dix répétitions et on répète chaque expérience trois fois. De plus, on procède à un test post-hoc pour savoir quel traitement diffère de l'autre.

Acclimatation et transfert des plants dans le sol :

Au bout de 7 jours d'exposition, on retire 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 le racinement abondant et l'acclimatation simultanée. On transfère les plants complets acclimatés sur le terrain et on mesure leur fréquence de survie.

RESULTATS ET DISCUSSION

Réponse de l'explant :

La réponse morphogénétique des bourgeons axillaires du propagule végétatif non embryogénique (Fig. 1) à des concentrations variées de cytokinine et d'auxine est présentée dans le Tableau I. Dans cette étude, on observe que deux ou trois changements de milieux sont nécessaires pendant la première semaine de culture pour éviter le suintement de substances laiteuses comme du latex du bourgeon axillaire *in vivo* pour obtenir une réponse satisfaisante. Cela coïncide avec les observations de Islam et coll., (1993) qui ont rapporté que deux ou trois changements de milieux sont bénéfiques pour une meilleure réponse *in vitro* des explants juvéniles de *Morus laevigata*. De plus, dans cette étude, on sélectionne le propagule juvénile à la croissance active comme explant du plant de mûrier mature cultivé sur le terrain parce qu'il répond plus facilement que le tissu mature. Cela est en accord avec les observations de Bonga (1987) qui a rapporté que la propagation clonale *in vitro* devient facile quand elle provient des parties juvéniles des espèces d'arbres.

Début des pousses :

Au bout de 15 jours de culture, les explants présentent leur première réponse par l'élargissement et la rupture du bourgeon axillaire (Fig. 2). Hossain et coll., (1992) ont observé une réponse similaire chez *Morus laevigata*. On observe le début de pousse avec une feuille (Fig. 3) à toutes les concentrations de régulateurs de croissance étudiées avec un pourcentage variable de réponse (38 – 90 %) au bout de 21 jours de culture. On observe la réponse la plus élevée de 90 % avec l'augmentation de la cytokinine BAP et de l'auxine TIBA jusqu'à respectivement 2 mg l^{-1} et 1 mg l^{-1} sur du LSBM. Mais une augmentation ultérieure du niveau de BAP et de TIBA supprime l'ébauche des pousses (Tableau I). Cette étude indique clairement que l'efficacité de la cytokinine BAP sur l'ébauche de pousses ne provoque pas d'amélioration si on l'administre seule. Cela est en accord avec les observations de Chattopadhyay et coll., (1990), qui ont rapporté que la combinaison d'auxine et de cytokinine est nécessaire pour l'ébauche de pousses chez le mûrier.

Multiplication des pousses :

On sectionne les bourgeons axillaires des pousses qui se sont formées *in vitro* et on les place en sous-culture sur le même milieu pour obtenir des pousses multiples. Au bout de dix jours de sous-culture, on obtient des pousses multiples avec tous les traitements essayés, mais on observe un nombre plus important de 8 à 10 pousses multiples (Fig. 4) sur du LSBM fortifié avec du BAP (2 mg l^{-1})

et du TIBA (1 mg l^{-1}). Cette amélioration du taux de multiplication est due à l'effet synergique de cytokinine et d'auxine dans le milieu. Sugimara et coll., (1998) ont procédé à la même observation et ils ont suggéré que pour obtenir une fréquence élevée de multiplication des pousses, il est nécessaire d'apporter de la cytokinine et de l'auxine au milieu de culture.

On place les pousses multiples en sous-cultures 4 à 5 fois pour obtenir un groupe de 30 à 35 pousses multiples saines, allongées et robustes (Fig. 5) sur le même milieu. On observe que la sous-culture répétée entraîne une multiplication rapide des pousses au taux moyen d'une multiplication de trois par sous-culture. Hossain et coll., (1992) ont rapporté des résultats similaires chez *Morus laevigata*. De plus, la multiplication et l'allongement des pousses augmente pendant les quatre premières sous-cultures, après quoi il se produit un déclin rapide du taux de multiplication. Pattnaik et coll., (1996) ont aussi observé un phénomène similaire chez le mûrier.

Racinement *ex vitro* :

On réussit un racinement *ex vitro* des pousses multiples dans un mélange de sol pour l'horticulture contenant des sels MS à moitié concentrés avec du NAA (1 mg l^{-1}) (Fig. 6). Cela est en contraste avec les observations de Katase (1994) qui a utilisé du vermiculats humidifié avec $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ d'hypoxex pour le racinement *ex vitro* du cultivar de mûrier Mitsushigeri. On remarque dans cette étude que le NAA (1 mg l^{-1}) est la meilleure auxine pour l'induction et le racinement abondant (14 à 16) de pousses multiples *ex vitro* par comparaison aux autres auxines essayées comme l'IAA (8 à 10) et l'IBA (9 à 11). De plus, on acclimate les plants racinés *in vitro* en utilisant un mélange de sol pour la culture des tissus sans aucun adjuvant (Fig. 7). Cette technique supprime une étape du racinement *in vitro*, ce qui diminue donc le coût général de la micromultiplication des plants. De plus, la production de plants au racinement abondant *ex vitro* est plus importante pour le transfert des régénérants dans le sol. On obtient 6,561 plants racinés *ex vitro* qui s'établissent dans le sol avec 90 % de fréquence de survie (5,904 plants).

Analyse statistique :

L'analyse statistique des données expérimentales révèle qu'il existe une différence très importante entre et à l'intérieur des traitements. On observe le nombre moyen le plus élevé de pousses par explant de 3,119 sur du LSBM fortifié avec du BAP (2 mg l^{-1}) et du TIBA (1 mg l^{-1}) et on observe le nombre moyen le plus faible avec du BAP (1 mg l^{-1}) seul (Tableau I). De plus, on observe le nombre moyen le plus élevé de racines par explant de 3,197 sur un mélange de sol contenant des sels MS à moitié concentrés avec du NAA (1 mg l^{-1}) et le nombre moyen le plus faible de 2,194 sur un mélange de sol contenant des sels MS à moitié concentrés avec de l'IAA ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) (Tableau II). L'analyse des données pertinentes au test post-hoc révèle que parmi les 190 et 66 couples de traitement, 98 et 38 couples diffèrent considérablement en ce qui concerne respectivement le nombre de pousses et de racines.

CONCLUSION

D'après les résultats et la discussion précédentes, on peut conclure qu'on peut facilement régénérer les explants de mûrier par la culture *in vitro* à grande échelle. De plus, en raison de la pollinisation croisée, l'hétérozygotie domine chez les espèces de mûrier et on ne peut donc pas conserver leur type avec la multiplication par les graines. On a donc entrepris cette étude dans le but principal d'obtenir des clones génétiquement similaires conformes. On peut adopter cette technique pour la multiplication clonale rapide chez d'autres variétés de mûrier.

SCREENING OF NATURAL ESSENTIAL OILS FOR UZIFLY MANAGEMENT

H. P. PUTTARAJU*, B. M. PRAKASH, SUMITHRA & N.M. GURUPRASAD

Laboratory of Seribiotechnology, Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore – 560 056.

Uzifly, Exorista bombycis (E. sorbillans) a tachinid endoparasitoid of silkworm, Bombyx mori L causes a heavy loss to the sericultural farming community in India. Though there are number of methods available to suppress this pest, but none of them yielding bottleneck result. An attempt has been made in the present study to suggest a suitable, effective and economical method to control this fly pest. Nine essential oils i. e., 1) Lavender oil, 2) White pine oil, 3) Citronella, 4) Terpeneol, 5) Eucalyptus oil, 6) Spearmint oil, 7) Thyme oil, 8) Pine oil and 9) Baroneol oil were screened against uziflies and their effectiveness was recorded. The oils were screened individually thrice a day for a period of two weeks. The results revealed that, Spearmint oil has excellent repelling efficiency while, Eucalyptus oil has good repelling efficiency during morning hours, around 8 a. m. for all 15 days. On the other hand, Citronella oil showed excellent insect repellent property whereas White Pine oil, Lavender oil, Terpeneol, Baroneol shows good insect repellent property at around 12 p. m. However around 6 p. m., Spearmint oil again showed its excellency in repelling uziflies, when compared to Citronella, Terpeneol, Eucalyptus oil and Pine oil which proved good repellents. These results suggest that, the natural oils show promising avenue to minimize the uzifly infestation, as they are directly amenable to climatic temperature prevailing during particular time and season.

Keywords: Uzifly, Essential oils, Repellent.

INTRODUCTION

Sericulture industry gives employment to over six million people in India alone. Pests and diseases cause major obstacle to the industry (Dandin, *et al.*, 2001), pests alone causes 20 to 25 percent yield loss in India (Senguptha, *et al.*, 1990). Uzifly, a tachinid obligate endoparasitoid of silkworm, *Bombyx mori* L. alone causes 10 to 15 % yield loss (Narashimha Rao, *et al.*, 1992). Despite the fact that the conventional chemical methods of pest control have several limitations i. e., development of resistance, persistence residues, contamination of food and water sources, environmental degradation, secondary outbreaks due to elimination of natural enemies etc., use of chemical pesticides continue to be widely adopted and remained to be the mainstay of insect pest control.

With the advent of integrated pest management to reduce/minimize pesticide use, other effective and environment friendly methods such as biological control, host resistance, bio-pesticides, plant materials etc., are being adopted and this trend has gained momentum in recent years. The conventional bio-control involves more or less the establishment of food chain against the target pests through introduction /release/ inundation of parasites and parasitoids. However the other successive line of bio-control, which has promising avenue to control insect pests include the exploitation of natural plant product such as essential oils, plant extracts from leaves, fruits, seed, root, etc., (Barnard, 1999). Keeping this in view, it was thought to study the efficacy of essential oils of natural origin for

* Corresponding author Email: puttarajuhp@hotmail.com

the control of uzifly. These oils include Lavender oil, White pine oil, Citronella, Terpeneol, Eucalyptus oil, Spearmint oil, Thyme oil, Pine oil, Boroneol oil. These oils are normally obtained by steam distillation of plant parts such as root / bark / heartwood / leaves (Tawatsin, *et al.*, 2001).

MATERIALS AND METHODS

The uzi maggots were collected from cocoon markets of Ramnagaram and Vijayapura of Bangalore district Karnataka, India as and when they emerged out from infested silkworm cocoons. They were brought to the laboratory and placed on sand in a petridish kept in wire mesh cage of 35 × 35 × 35 cubic cm where they metamorphose into pupae and then adult. After emergence, the flies were sexed based on genitalia and other morphological sexed specific characters and reared in separate cages by providing 8% glucose soaked in cotton as food (Manjunatha, 1993). Accordingly there were five cages with each containing 150 flies of males and females. Simultaneously, the stock solutions of natural essential oils were prepared as follows. Seven ml of active ingredient (natural oils) was dissolved in 3ml of anionic detergent and this became a stock of essential oil solution. The stock solution was further diluted to 2 to 8% by adding 92 to 98 ml of water. Then 5 × 15 cm strips of blotting papers were soaked in natural oils of different concentration and waved in the direction opposite to the flow of wind in front of the cages. The data on repelling efficiency were recorded by visual observation thrice a day for a period of two week as shown in Table I, II and III.

Table I. Degree of repellency of different essential oils in different concentrations during morning hours.

Tableau I. Degré répulsif de différentes huiles essentielles à différentes concentrations pendant les heures de la matinée.

SL No. Compounds		Percentage composition						
No. de Composés série		Composition en pourcentage						
		2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%
1	Lavender oil							
	<i>Huile de lavande</i>	C	C	C ⁺⁺	B	B	B	B
2	White pine oil							
	<i>Huile de pin blanc</i>	C	C ⁺	C ⁺	C ⁺⁺	C ⁺⁺	C ⁺⁺	C ⁺⁺
3	Citronella							
	<i>Citronelle</i>	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺
4	Terpeneol	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺
5	Eucalyptus oil							
	<i>Huile d'Eucalyptus</i>	B	B	B	B	B ⁺	B ⁺	B ⁺
6	Spearmint oil							
	<i>Huile de menthe verte</i>	B ⁺	A	A	A	A	A	A
7	Thyme oil							
	<i>Huile de thym</i>	C	C	C ⁺	C ⁺⁺	B	B	B
8	Pine oil							
	<i>Huile de pin</i>	C	C	C ⁺	C ⁺⁺	C ⁺⁺	B	B
9	Boroneol	C ⁺	C ⁺⁺	B	B	B ⁺	B ⁺	B ⁺

The repelling efficiency of different essential oils were measured based on the percentage of flies repelled from one side of the cage to another when the blotting paper strips dipped in essential oil's were waved as A- 100% repellency (Excellent repellent); B⁺⁺ - 90 to 98% repellency (Better than B⁺); B⁺ - 75 to 89% repellency (better than B); B - 60 to 74% repellency (good repellency); C⁺⁺ - 45 to 59% (better than C⁺); C⁺ - 30 to 44% (better than C) and C -15 to 29%(Show repelling efficiency).

RESULTS AND DISCUSSION

The results revealed that, the Spearmint oil showed a constant excellent repelling efficiency in all concentration tested while, Citronella gave slightly lesser efficiency but constant good repellency in all concentrations. It can be explained that the temperature prevailing in the morning hours is conducive for the evaporation and spread of spearmint oil so, it yields an excellent repellent property. On the other hand, white Pine oil and Terpeneol showed lesser repelling efficiency. However, Lavender oil, Eucalyptus oil, Thyme oil, Pine oil and Boroneol oils indicated their increased repelling efficiency with increased concentration during morning hours of the day as shown in Table I. This may be due to the increased active molecular concentration in solution with increased percentage of essential oils that inturn increases the spreading of active molecules. The extent of repelling efficiency depended on good evaporation of repellents and it can be explained by the chemical structure of individual compounds as described by Milutinovic, *et al.*, (2002).

Table II. Degree of repelling efficiency of different essential oils in different concentrations during after noon hours.

Tableau II. Degré d'efficacité répulsive de différentes huiles essentielles à différentes concentrations pendant les heures de l'après-midi.

SL No. Compounds		Percentage Composition						
No. de Composés série		Composition en pourcentage						
		2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%
1	Lavender oil <i>Huile de lavande</i>	B	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺
2	White pine oil <i>Huile de pin blanc</i>	B ⁺	B ⁺⁺	B ⁺⁺	B ⁺⁺	B ⁺⁺	B ⁺⁺	B ⁺⁺
3	Citronella <i>Citronelle</i>	A	A	A	A	A	A	A
4	Terpineol	B	B	B	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺
5	Eucalyptus oil <i>Huile d'Eucalyptus</i>	B ⁺	B ⁺	B ⁺	A	A	A	A
6	Spearmint oil <i>Huile de menthe verte</i>	B	B ⁺⁺	B ⁺⁺	B ⁺⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺
7	Thyme oil <i>Huile de thym</i>	C	C ⁺	B	B	B ⁺	B ⁺	B ⁺
8	Pine oil <i>Huile de pin</i>	C ⁺	C ⁺	C ⁺⁺	C ⁺⁺	B	B	B
9	Boroneol	B	B	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺⁺	B ⁺⁺

Table III. Degree of repelling efficiency of different essential oils in different concentration during evening hours.**Tableau III. Degré d'efficacité répulsive de différentes huiles essentielles à différentes concentrations pendant la soirée.**

Sl. No. Compounds		Percentage Composition						
No. de Composés série		Composition en pourcentage						
		2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%
1	Lavender oil <i>Huile de lavande</i>	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺⁺	B	B
2	White pine oil <i>Huile de pin blanc</i>	C	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺	C ⁺
3	Citronella <i>Citronelle</i>	B	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B	B	B
4	Terpineol	B	B	B	B	B	C ⁺⁺	C ⁺⁺
5	Eucalyptus oil <i>Huile d'Eucalyptus</i>	B	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺	B ⁺
6	Spearmint oil <i>Huile de menthe verte</i>	B ⁺⁺	A ⁺	A ⁺	A ⁺	A ⁺	A ⁺	A ⁺
7	Thyme oil <i>Huile de thym</i>	C	C	C	C	C	C	C
8	Pine oil <i>Huile de pin</i>		C	C ⁺	C ⁺⁺	C ⁺⁺	B	B
9	Boroneol	C	C ⁺	C ⁺⁺	B	B	B	B

A- 100% repellency / *Effet répulsif de 100 %*.B⁺⁺- 90 to 99 % repellency / *Effet répulsif de 90 à 99 %*.B⁺- 75 to 89 % repellency / *Effet répulsif de 75 à 89 %*.B- 60 to 74% repellency / *Effet répulsif de 60 à 74 %*.C⁺⁺- 45 to 59 % repellency / *Effet répulsif de 45 à 59 %*.C⁺- 30 to 44% repellency / *Effet répulsif de 30 à 44 %*.C - 15 to 29% repellency / *Effet répulsif de 15 à 29 %*.

The level of repelling efficiency of different repellants / essential oils changes during midday when compared to that of morning hours. All the tested essential oils have shown their repelling efficiency against uzifly, but Citronella stands first in its repellency during midday while Spearmint oil stands first during morning hours. Spearmint oil was nearer to Citronella at 3%, 4% and 5% with decreased repellency as and when concentration increases. The excellency of Citronella may be due to its excellent evaporation property at higher temperature, so the increased repellency. The white Pine oil, Lavender oil, Spearmint oil, Boroneol oil has shown as good repellency against uzifly. Eucalyptus oil on the other hand showed very good repellent at different concentrations upto 4% level, while at 5-8% level it showed that it has excellent repellency. The Thyme oil and Pine oil revealed medium repelling efficiency and their degree of repelling efficiency increases as concentration

increases as shown in Table II. The overall repellency pattern of all essential oils during midday can be explained by the mechanism that, all oils showed increased evaporation with increased temperature.

The repellency of the uzi fly against different repellents during evening hours yielded not much comparable result to that of morning hours throughout the tested period. The Spearmint oil stands first in the evening hours and showed excellent repelling efficiency while, Citronella, Terpineol, Eucalyptus oil and Pine oil have meager repelling efficiency at lower concentrations, i. e., 2%, 3% and 4% and their degree of repelling efficiency was increased at 5% level and showed constancy upto 8% level. At the same time Lavender oil, white Pine oil and Thyme oil evolved as meager insect repellents as shown in Table III. These results further explained the role of temperature in the efficacy of different natural oils.

The results also demonstrate that, in all tested concentrations of all essential oils, the females have higher degree of repellency when compared to males.

The present data confirmatively predicted that, the degree of repelling efficiency depends on the available climatic temperature (Milutinovic, *et al.*, 2002) as it is evident from increased repelling efficiency during midday in the present study and Spearmint oil, Citronella oil and Eucalyptus oil evolved as potential excellent repellents in repelling uzi flies.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to R.N. Kamath of Sri Durga Biotech of Bangalore for providing the required essential oils.

REFERENCES

- BARNARD D.R., 1999, Repellency of essential oils to mosquitoes (Diptera: Calicidae). *J Med. Entomol.*, 36(5), p. 625-629.
- DANDIN S.B., JAYASWAL J., GIRIDHAR K., 2001, Hand Book of Sericulture Technologies. Pub: P. Joy Oomen, CSB Complex. Bangalore.
- MANJUNATHA H.B., 1993, Morphological and cytological investigation on the Uzi fly, *Exoristia bombycis*. Ph. D. Thesies, Bangalore University: Bangalore.
- MILUTINOVIC R., STAJKOVIC N., MILIK J., 2002, Assessment of efficiency of repellent preparations containing Ethylbutylacetylaminopropionate. *Cosmotices*, 128, p. 14-16.
- NARASHIMHA RAO G., VEERANNA., PRASAD N. R., 1992, Studies on the infestation of *Exorista sorbillans* on *Bombyx mori*. L. 1. Incidence during monsoon season. In: Recent Adv. Uzi fly Res. p. 49-56.
- SENGUPTHA K., PRADIP KUMAR., BAIG M., GOVINDAIAH., 1990, Hand Book on pest and disease control of Mulberry and silk worm. United Nations Publication, Bangkok, Thailand.
- TAWATSIN A., WRATTEN S. D., SCOTT R.R., THAVARA V., TECHADAMRAGSIN Y., 2001, Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *J. Vector Ecology.*, 26(1), 6-82.

EVALUATION DES HUILES ESSENTIELLES NATURELLES POUR LUTTER CONTRE LA MOUCHE UZI

H. P. PUTTARAJU*, B. M. PRAKASH, SUMITHRA & N. M. GURUPRASAD

Laboratory of Seribiotechnology, Department of Sericulture, Bangalore University,
Bangalore – 560 056, Inde

*La mouche uzi, **Exorista bombycis** (**E. sorbillans**) un endoparasitoïde tachinaire du ver à soie, **Bombyx mori** L. entraîne des pertes importantes pour la communauté des fermiers séricicoles en Inde. Bien qu'il existe un certain nombre de méthodes pour supprimer ce parasite, aucune ne donne de résultats très restrictifs. Nous avons essayé dans cette étude de suggérer une méthode adaptée, efficace et économique pour lutter contre cette mouche parasite. Nous avons analysé neuf huiles essentielles 1) l'huile de lavande, 2) l'huile de pin blanc, 3) la citronnelle, 4) le terpinéol, 5) l'huile d'Eucalyptus, 6) l'huile de menthe verte, 7) l'huile de thym, 8) l'huile de pin et 9) l'huile de baronéol contre les mouches uzi et nous avons mesuré leur efficacité. On teste les huiles individuellement trois fois par jour pendant une période de deux semaines. Les résultats révèlent que l'huile de menthe verte a une excellente efficacité répulsive tandis que l'huile d'Eucalyptus a une bonne efficacité répulsive pendant les heures de la matinée autour de 8 heures pendant 15 jours. D'autre part, l'huile de citronnelle a une excellente propriété répulsive contre les insectes tandis que l'huile de pin blanc, l'huile de lavande, de terpinéol et baroniale présentent une bonne efficacité répulsive vers midi. Autour de 6 heures du soir, l'huile de menthe verte est excellente pour repousser les mouches uzi, par comparaison à l'huile de citronnelle, de terpinéol, d'eucalyptus et de pin qui s'avèrent de bons répulsifs. Ces résultats suggèrent que les huiles naturelles s'avèrent une voie prometteuse pour minimiser l'infestation par la mouche uzi, puisqu'elles sont directement sensibles aux conditions climatiques quotidiennes et selon la saison.*

INTRODUCTION

L'industrie de la sériciculture donne des emplois à plus de six millions de personnes en Inde. Les parasites et les maladies sont des obstacles majeurs pour l'industrie (Dandin et coll., 2001), les parasites à eux seuls entraînent 20 à 25 % de perte de rendement en Inde (Senguptha et coll., 1990). La mouche uzi, un endoparasitoïde tachinaire obligatoire du ver à soie *Bombyx mori* L. entraîne à elle seule 10 à 15 % de perte de rendement (Narashimba Rao et coll., 1992). Bien que les méthodes chimiques conventionnelles de lutte contre les parasites aient plusieurs limites telles que, le développement de la résistance, la persistance de résidus, la contamination des sources de nourriture et de l'eau, la dégradation environnementale, les éruptions secondaires en raison de l'élimination des ennemis naturels, on continue à utiliser largement les pesticides chimiques et ils demeurent le pivot de la lutte contre les insectes parasites.

Avec l'avènement de la lutte intégrée contre les parasites pour réduire / minimiser l'utilisation de pesticides, on adopte d'autres méthodes efficaces et non nuisibles à l'environnement telles que la lutte biologique, la résistance de l'hôte, les bio-pesticides, les matériaux de plantes et cette tendance a pris de l'essor récemment. La lutte biologique conventionnelle implique en gros l'établissement

* Email de l'auteur auquel adresser la correspondance : puttarajuhp@hotmail.com

d'une chaîne alimentaire contre les parasites ciblés par l'introduction / la libération / l'inondation de parasites et parasitoïdes. Cependant, l'autre voie dans la lutte biologique, avec un avenir prometteur pour lutter contre les insectes parasites comprend l'exploitation de produits naturels à base de plantes tels que les huiles essentielles, les extraits de plantes à partir des feuilles, des fruits, des graines, des racines, etc.. (Barnard, 1999). Compte tenu de cela, nous avons pensé à étudier l'efficacité d'huiles essentielles d'origine naturelle pour lutter contre la mouche uzi. Ces huiles sont l'huile de lavande, l'huile de pin blanc, de citronnelle, de terpinéol, l'huile d'eucalyptus, l'huile de menthe verte, l'huile de thym, l'huile de pin, l'huile de boronéol. On obtient normalement ces huiles par la distillation à la vapeur des parties des plantes telles que la racine / l'écorce / le cœur du bois / les feuilles (Tawatsin et coll., 2001).

MATERIELS ET METHODES

On recueille les larves uzi auprès des marchés à cocons de Ramnagaram et de Vijayapura dans la zone de Bangalore, dans le Karnataka en Inde lorsqu'elles émergent des cocons de vers à soie infestés. Elles sont amenées au laboratoire et placées sur du sable dans une boîte de Petri conservée dans une cage en fer grillagé de $35 \times 35 \times 35 \text{ cm}^3$ où elles se métamorphosent en nymphes puis en adultes. Après l'émergence, on sexe les mouches en fonction de leurs organes génitaux et d'autres caractères spécifiques morphologiques spécifiques au sexe et on les élève dans des cages séparées en apportant comme nourriture une solution à 8 % de glucose sur du coton (Manjunatha, 1993).

En conséquence, il y a cinq cages contenant chacune 150 mouches mâles et femelles. Simultanément, on prépare les solutions mères des huiles essentielles naturelles comme suit. On dissout sept ml d'ingrédient actif (huiles naturelles) dans 3 ml de détergent anionique pour obtenir une solution mère d'huile essentielle. On dilue à nouveau la solution mère de 2 à 8 % en ajoutant 92 à 98 ml d'eau. Puis on trempe des bandes de papiers buvard de $5 \times 15 \text{ cm}$ dans les huiles naturelles aux différentes concentrations et on les agite dans la direction opposée au flux du vent devant les cages. On enregistre les données sur l'efficacité répulsive par observation visuelle trois fois par jour pendant une période de deux semaines comme le montrent les Tableaux I, II et III.

On mesure l'efficacité répulsive des différentes huiles essentielles d'après le pourcentage de mouches repoussées d'un côté de la cage à l'autre quand on agite les bandes de papier buvard trempées dans des huiles essentielles en tant que A – répulsion à 100 % (répulsif excellent) ; B^{++} - 90 à 98 % de répulsion (mieux que B^+) ; B^+ - 75 à 89 % de répulsion (mieux que B) ; B - 60 à 74 % de répulsion (bon répulsif) ; C^{++} - 45 à 59 % (mieux que C^+) ; C^+ - 30 à 44 % (mieux que C) et C - 15 à 29 % (montre une répulsion).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats révèlent que l'huile de menthe verte présente une excellente efficacité répulsive constante à toutes les concentrations testées tandis que la citronnelle donne une efficacité légèrement moindre mais une bonne répulsion constante à toutes les concentrations. La température dominante pendant les heures de la matinée est propice à l'évaporation et aussi à la diffusion de l'huile de menthe verte, elle donne une excellente propriété répulsive. D'autre part, l'huile de pin blanc et de terpinéol présentent une efficacité répulsive inférieure. Cependant, l'huile de lavande, l'huile d'eucalyptus, l'huile de thym, l'huile de pin et de boronéol présentent une augmentation de leur efficacité répulsive en fonction de la concentration au cours des heures de la matinée comme le montre le Tableau I. Cela pourrait être dû à l'augmentation de la concentration moléculaire active dans la solution avec l'augmentation du pourcentage en huiles essentielles qui à son tour augmente la diffusion des molécules actives. Le degré d'efficacité répulsive dépend de la bonne évaporation des répulsifs et on peut l'expliquer par la structure chimique des composants individuels comme l'ont décrite Milutinovic et coll., (2002).

Le niveau d'efficacité répulsive de différents répulsifs / huiles essentielles change vers midi. Toutes les huiles essentielles testées sont efficaces contre la mouche uzi, mais la citronnelle se classe première comme répulsif à midi tandis que l'huile de menthe verte se classe première aux heures de la matinée. L'huile de menthe verte est plus proche de la citronnelle à 3 %, 4 % et 5 % avec une baisse de la répulsion quand on augmente la concentration. L'excellence de la citronnelle pourrait être due à son excellente propriété d'évaporation à une température plus élevée, d'où l'augmentation de l'efficacité. L'huile de pin blanc, l'huile de lavande, l'huile de menthe verte, l'huile de boronéol présentent une bonne répulsion contre la mouche uzi. D'autre part, l'huile d'eucalyptus s'avère un très bon répulsif à différentes concentrations jusqu'à 4 % tandis qu'à 5 à 8 %, la répulsion est excellente. L'huile de thym et l'huile de pin présentent une efficacité répulsive moyenne et leur degré d'efficacité répulsive augmente alors que la concentration augmente comme le montre le Tableau II. On peut expliquer le schéma général de répulsion de toutes les huiles essentielles à midi par le fait que toutes les huiles s'évaporent plus avec l'augmentation de la température.

La répellence de la mouche uzi par rapport à différents répulsifs pendant les heures de la soirée ne donne pas de résultats comparables à ceux pendant les heures de la matinée au cours de toute la période de test. L'huile de menthe verte se classe première pendant les heures de la soirée et montre une excellente efficacité répulsive tandis que l'huile de citronnelle, de terpinéol, d'eucalyptus et l'huile de pin ont une faible efficacité répulsive à des concentrations plus faibles, c'est à dire 2 %, 3 % et 4 % et leur degré d'efficacité répulsive augmente à 5 % et montre une constance jusqu'à 8 %. Au même moment, l'huile de lavande, l'huile de pin blanc et l'huile de thym sont de faibles répulsifs des insectes comme le montre le Tableau III. Ces résultats indiquent également le rôle de la température dans l'efficacité des différentes huiles naturelles.

Les résultats montrent aussi, qu'à toutes les concentrations testées de toutes les huiles essentielles, les femelles ont un degré élevé de répulsion par comparaison aux mâles.

Les données actuelles montrent que le degré d'efficacité répulsive dépend de la température présente (Milutinovic et coll., 2002), cela est évident d'après l'augmentation de l'efficacité répulsive à midi obtenue au cours de cette étude et l'huile de menthe verte, l'huile de citronnelle et l'huile d'eucalyptus sont d'excellents répulsifs potentiels pour repousser la mouche uzi.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.

- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.

- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.

- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

