

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

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY

Managing Director
Chief 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*)
DOÏRA 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)
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

Revues / Reviews

- Microsporidians infecting silkworm, *Bombyx mori* L. – a review** 1
 Revue sur les microsporidiens infestant le ver à soie, *Bombyx mori* L. 17
 R. N. SINGH, A. G. K. DANIEL, S. S. SINDAGI & C. K. KAMBLE
- Utilization of sex limited breeds in silkworm seed production in India – a review** . . 29
 Utilisation de lignées limitées au sexe dans la production de graines en Inde 37
 C. R. HEGDE & C. K. KAMBLE

Articles scientifiques / Scientific papers

- Expression of messenger RNA encoding a Y-box protein of the silkworm, *Bombyx mori* and accumulation in ovarian follicle cells** 41
 Expression de l'ARN messager codant une protéine de la boîte-Y du ver à soie, *Bombyx mori* et accumulation dans les cellules folliculaires de l'ovaire 49
 K. YAMAMOTO, T. OKADA, Y. BANNO & H. FUJII
- Comparative analysis of cuticle proteins of the silkworm by two-dimensional electrophoresis** 53
 Analyse comparative des protéines de la cuticule du ver à soie par électrophorèse en deux dimensions 59
 K. YAMAMOTO, P. ZHANG, Y. BANNO, F. MIAKE, K. NISHIKAWA, A. NISHISAKA & K. TAMURA
- Role of mulberry nutrition on manifestation of post cocoon characters of selected races of the silkworm, *Bombyx mori* L.** 63
 Rôle de la nutrition sur la manifestation des caractères post-cocon chez des races sélectionnées du ver à soie *Bombyx mori* L., ... 77
 F. AHMAD MALIK & Y. SRINIVASA REDDY

Rapports techniques / Technical reports

- Leaf quality of mildew affected leaves and their effect on mortality and economic characters of silkworm, *Bombyx mori* L.** 87
 Qualité des feuilles de mûrier atteintes par le mildiou et effet sur les caractères économiques et sur la mortalité du ver à soie, *Bombyx mori* L. 93
 S. MANIMEGALAI & N. CHANDRAMOHAN

Comparative performance of <i>Tephrosia purpurea</i> (Fabaceae) and <i>Sesbania aculeata</i> (Fabaceae) in improving the physicochemical properties of soil of mulberry field – a first report	97
Premier rapport sur la performance comparative de <i>Tephrosia purpurea</i> (Fabaceae) et de <i>Sesbania aculeata</i> (Fabaceae) pour l'amélioration des propriétés physicochimiques du sol dans les muraies	105
S. MASILAMANI, S. M. H. QADRI, A. GUHA, S. JAYARAJ & S. B. DANDIN	
<i>In vitro</i> multiple shoots from nodal explants of mature <i>Ricinus communis</i>	109
Obtention de pousses multiples <i>in vitro</i> à partir d'explants nodaux de <i>Ricinus communis</i> .	113
A. SRIVASTAVA	

MICROSPORIDIANS INFECTING SILKWORM, *BOMBYX MORI* L - A REVIEW

R. N. SINGH, A. G. K. DANIEL, S. S. SINDAGI & C. K. KAMBLE

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmelram post, Kodathi, Bangalore-560035, India.

Microsporidiosis of silkworms has been understood since long, to be caused by a highly virulent parasitic microsporidian, Nosema bombycis Naegeli. Different strains and species have since been isolated from the infected silkworms and the disease epizootic has become increasingly complex as more number of strains and species are being identified to be infecting silkworms. It differs from other silkworm diseases, as it is transmitted both horizontally and vertically. It is very much needed to collect and compile the information pertaining to pebrine in order to help the researchers to develop efficient method to control the disease. Therefore, an attempt has been made in this direction to review the literature on microsporidians infecting silkworm, Bombyx mori L.

Keywords: *Bombyx mori* L., microsporidia, *Nosema bombycis*, *Nosema* sp., germination, incidence, contamination, transmission, multiplication, cross infectivity, life cycle, SSU-rRNA, identification.

INTRODUCTION

Microsporidians are a diverse group of spore-forming obligatory parasitic amitochondrial protozoans that includes more than 1200 species belonging to 143 genera (Weiss and Keohane, 1999; Hoffman *et al.*, 2003). Microsporidia are eukaryotes with distinct nucleus and nuclear envelop, but they do not have centrioles or mitochondria and are considered unique among the eukaryotes because their small sub-unit ribosomal RNA (SSU-r RNA) genes are smaller than those of typical eukaryotes (Vossbrinck *et al.*, 1993). Recent analyses using tubulin, rRNA and Hsp70 data, support the placement of microsporidia within fungi (Edlind *et al.*, 1996; Keeling and Doolittle, 1996; Fast *et al.* 1999; Hirt *et al.*, 1997, 1999). These organisms have been shown to be pathogens of a wide range of animal hosts, including insects, fish and mammals. *Nosema bombycis* (Naegeli, 1987) is the most dreaded pathogen of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, causing the pebrine disease that devastated the silk industry in France during the mid 19th century. Pasteur (1870) identified the cause of the disease and also suggested the control method. Abe and Fujiwara (1979) studied the mode of multiplication of *Pleistophora* sp. in the midgut epithelium of the silkworm. Sasidharan *et al.*, (1994) studied the multiplication of *Nosema bombycis* spores in different tissue of silkworm, *Bombyx mori*. Sato *et al.*, (1981) studied the serological discrimination of several kinds of microsporidian spores isolated from *B. mori* using an indirect fluorescent antibody technique. Sato *et al.*, (1982), on the basis of spore structure, determined that *Nosema* M12 was not really *Nosema* but a species of *Vairimorpha*. Hayasaka and Ayuzawa (1987) suggested a diagnostic method, using antibody – sensitized latex, to identify *N. bombycis* and its closely related species. Baker *et al.*, (1994) studied the phylogenetic relationship between *Vairimorpha* and *Nosema* sp. using rRNA sequence data. Baker *et al.*, (1995) established the phylogenetic relationship of several microsporidian genera using small sub-unit ribosomal DNA (SSU-r DNA) sequence similarity. Hatakeyama *et al.*, (2000) used SSU-r RNA sequencing to study the systematic position of microsporidians isolated from *Antheraea mylitta* and

established that it was very close to *N. bombycis*, but differed widely from *Vairimorpha*, *Encephalitozoan*, and *Pleistophora*. Approximately 600 among 1000 named species of microsporidia have been reported from insects, and the exact number of described species ranging from approximately 900 to 1300 (Sprague and Beemel, 1999). First report of pebrine disease occurrence was recorded in 1859 from Bengal province of India and after that Pebrine incidence was occurred intermittently in different parts of the India.

Since more than a century, fight against pebrine has continued but loss due to this disease has not been completely eliminated. Therefore, in this review an attempt has been made to highlight on various aspects of the silkworm microsporidian studies carried out by the scientists.

Classification:

The taxonomy of microsporidia has undergone several revisions during the past few decades. In recent years, recognizing the uniqueness of microsporidia, several protozoologists have elevated these organisms to the level of a distinct Phylum the Microsporidia or Microspora (Weiser, 1977; Sprague, 1977, 1982 and Issi, 1986). Most microsporidiologists of today follow the system developed by Sprague (Brooks, 1988; Canning, 1990). In general, all the present day workers agree to recognize the group as a distinct Phylum. The classification of certain genera under the class Microspora (e.g. *Nosema*, *Perezia*, *Glugea* and *Encephalitozoam*) has been changed considerably. In 1905, Pirez redefined the genus *Nosema* and introduced the term "monosporous" which has interpreted by subsequent workers to mean one spore from one sporont. This has led to confusion in *Nosema* for nearly half-a-century. In *Nosema bombycis*, the type species, the sporont gives rise to two spores (Ishihara, 1969; Cali, 1971).

In genus *Nosema* contains the largest number of species and still represents a heterogeneous group from which many species will have to be removed to other genera. The taxonomy of microsporidian genera and species is based on differences in morphology, life cycle and parasite – host relations. It is held in general now that these are inadequate in several cases and the need for other criteria like; biochemical analysis and serology have been recognized.

Recent molecular genetic studies of microsporidians drastically changed traditional taxonomy and phylogeny of microsporidia. Vossbrinck *et al.*, (1987) demonstrated that the genomic sequence coding for the small subunit 16 S ribosomal RNA (SSU-r RNA) of an insect microsporidian *Vairimorpha necatrix*, greatly differ from those of the counterparts of other eukaryotes. Katinka *et al.*, (2001) reported the DNA sequence of 11 chromosomes out of the 2.9 mega base (Mb) genome in a mammalian pathogen. *Encephalitozoon cuniculi*, including 1997 potential protein coding genes. In recent years, molecular phylogeny studies of microsporidia have identified several genes, including those for mitochondrial Hsp70, α - β tubulins and translation elongation factors, suggesting a close affinity of microsporidia with the fungi (Weiss and Vossbrinck, 1999; Wittner, 1999).

Systematic position of *Nosema bombycis* (Sprague, 1979):

Phylum:	Microspora
Class:	Microsporea
Order:	Microsporida
Sub-order:	Apanosporoblastina
Genus:	<i>Nosema</i>
Species:	<i>Nosema bombycis</i>

History of disease:

Microsporidiosis of silkworm is caused by a highly virulent parasitic microsporidian, *Nosema bombycis*. Interestingly, the first microsporidian to be named was *Nosema bombycis* Naegeli in 1857. It was discovered as the etiological agent of the "Pebrine" epidemic of silkworms which occurred in Europe in the mid nineteenth century, commanding the attention of many eminent scientists. Later

by the end of the 19th Century, the disease spread to all sericulture countries of Europe resulting in total decline of silk production.

The noted French microbiologist, Louis Pasteur (1870) was the first who made a detailed study on the growth and multiplication of the pathogen. He first detected the transmission of pebrine through egg and suggested the method of mother moth examination for production of disease free silkworm seed. In India, pioneering work on various aspects of the disease was done by Mukherjee (1919), Jameson (1922) and Ghosh (1949).

In the tropics Pebrine is commonly prevalent in Thailand, Cambodia, Vietnam, etc. The incidence is high in the countries where the farmers produce their own silkworm seed. The first record of wide spread occurrence of Pebrine in India was in the later part of the 19th century, when the epidemic swept through Kashmir. In 1890 – 1900, the disease appeared on an epizootic scale in the then Mysore and Madras provinces. Thereafter, it reappeared during 1925-1930 in an epizootic form (Chitra *et al.*, 1975). Lefroy (1916) concluded that Pebrine was probably prevalent in Bengal as early as in 1875 and in Mysore between 1890 and 1900, which was the cause of frequent crop failures in those regions during that time. In Mysore seed area disease outbreak was observed during 1940-1947. Periodical outbreaks have occurred since then. In southern parts of India, disease epidemic occurred during 1991-1992, which resulted in substantial loss of crops and revenue to the state. It was for the first time in the history of sericulture of South India an unusually high incidence of Pebrine was observed at all levels of basic seed multiplication including commercial silkworm rearing. Later on, incidence of disease is being noticed intermittently in silk crops of South India, besides remaining parts of India.

Silkworm microsporidians:

In addition to *Nosema bombycis*, the microsporidians belonging to the genera *Nosema*, *Pleistophora* and *Thilohania* have been isolated from the silk moth (Fujiwara, 1984a, b). These microsporidians differ in their morphology, target tissues and virulence and have been tentatively designated as M11, M12 and M14 (*Nosema sp.*); M24, M25 and M27 (*Pleistophora sp.*) and M32 (*Thilohania sp.*). Three microsporidians designated as NIK-2r (*Nosema sp.*, Mysore), NIK-3h (*Nosema sp.* M11, Hassan) and NIK-4M (*Nosema sp.* M12, Mysore) have been isolated from Karnataka and these are immunologically dissimilar with *Nosema bombycis* (Ananthalakshmi *et al.*, 1994a). Recently, scientists of seed pathology division, Silkworm Seed Technology Laboratory, Central Silk Board, Bangalore, have isolated two new microsporidians from silkworms tentatively named as Strain-1 and Strain-2. These microsporidians are different from standard strain of *Nosema bombycis* on morphological and pathological aspects.

Mode of infection and transmission:

All microsporidians are intracellular parasite of great reproductive capacity and are characterized by the possession of thick walled spores containing a polar filament and an infective agent or sporoplasm. Microsporidia invade insects through these natural portals of entry: oral, cuticular and ovarian pathways (Kramer, 1976). Entrance by the oral and cuticular portal results in horizontal transmission and by the ovarian portal in vertical. The oral portal is the most common route through which mature spores of the microsporidians gains access to the host tissues as in the case of *Nosema bombycis* infecting silkworms or *Nosema apis* which infects the digestive tract of adult honey bees. Transmission through faeces contaminated with microsporidians spores commonly occurs in susceptible hosts (Andreadis, 1987). In the ovarian portal mode occurring in the case of *Nosema bombycis*, the pathogen is incorporated into the egg or embryo within the female's reproductive tract and the progeny from such infected females are also infected. In certain cases, even though the microsporidium is within an egg, transovarial transmission does not occur. In a recorded case in the winter moth, *operophtera brumata* (Lepidoptera), the embryo within an egg is not infected, but the larva subsequently becomes infected when the microsporidian spores are ingested together with the

remains of the yolk as the larva eats its way through the egg shell (Canning *et al.*, 1985). Thus infection is similar to that of a larva feeding on spores contaminating the surface of the eggshell.

Morphological and ultra structural characteristics of the spore:

The most distinct, unique and complicated structure of the microsporidium is the spore which is the infective stage of the pathogen. It is probably the smallest eukaryote cell. It is the only stage in the life cycle of the pathogen capable of surviving outside of the host. It has a characteristic sporoplasm extrusion apparatus that includes the polar filament. This apparatus is uniquely adopted for inoculation of the sporoplasm into a host. The spore generally lacks reserve substances (Maurand and Loubis, 1973). They lack mitochondria also. Basically the spore has three components i.e. sporoplasm, extrusion apparatus and spore envelope.

A mature spore is oval or ovocylindrical and measures approximately $3.6 \pm 0.2\mu\text{m}$ in length and $2.3 \pm 0.2\mu\text{m}$ in width. They possess uniform size and shapes. *Nosema bombycis* is dimorphic as it produces two kinds of spores in its life cycle: a mature oval long coiled type spore and another pyriform type coiled spores. The viable spores are generally refractive under the microscope and can be distinguished easily by this property.

Ultra structurally, the spore has a thick outer spore wall consisting of these layers; an outer proteinaceous exospore, a middle chitinous endospore and an inner plasma membrane (Vavra, 1976; Sprague, 1982; Larsson, 1986). The exospore is soluble in strong alkali. Its surface is usually finely corrugated and may be ornamented with ridges. The endospore is composed of a protein-chitin complex. This layer provides the spore wall with the resistance sufficient to withstand the internal pressure generated during polar filament extrusion.

The sporoplasm has one or two nuclei. It is not separated by a bounding membrane from the polar filament extrusion apparatus. The limiting membrane of sporoplasm is acquired during the passage of the sporoplasm through the extruded filament (Vavra, 1976). The extrusion apparatus of the spore is unique and is a complex structure. It occupies most of the spore and consists of the polar filament, with its anchoring apparatus, and the polaroplast. Towards the posterior end of the spore is a posterior vacuole. At the anterior part of the spore the anchoring disc "Polar cap", to which the basal end of the polar filament is attached, is enclosed in the polar sac or polaroplast (Huger, 1960; Larsson, 1986). The disc functions as a hinge when the filament is everted. The polar filament – polaroplast complex is considered to be derived from the same membrane system.

The polar tube serves as an "inoculating needle" and its presence in spore places an organism in the Phylum Microspora (Issi, 1986). It is typically thread like and is anchored at the anterior position (polaroplast complex) of the spore wall by a multilayered anchoring disc (Vavra, 1976; Larsson, 1986). The filament extrudes posteriorly and forms coils, which wind around the inner surface of the spore wall. The basal position of the filament near the attachment site is thicker than its other parts. The number of coils of the filament within the spores may vary in a single species which is typically the case in *Nosema bombycis*: one with a few coils and a second type with many coils (Iwano and Ishihara, 1991). The extruded polar filament is about $0.1\mu\text{m}$ in diameter and in some cases up to $400\mu\text{m}$ long. Recently two new microsporidians (strain-1 & strain-2) isolated from silkworm at Silkworm Seed Technology Laboratory, Central Silk Board, Bangalore also showed variation in the number of coils in spores.

Spore germination:

The germination of the spores coincides with the extrusion of polar filament. It is affected by several factors like changes in pH, types of ions present, osmotic pressure around spores, temperatures conditions inhibiting substances and biochemical properties of the spores (Undeen, 1990). Undeen (1990) has proposed a hypothesis on the mechanism of microsporidian spore germination based upon the conversion of intra sporal trehalose into reducing sugars resulting in increased osmotic pressure followed by rapid movement of water into the spore and subsequent extrusion of the polar filament.

Artificial germination methods of microsporidian spores have been studied by several investigators (Undeen, 1978, 1983; Oshima, 1964; Ishihara, 1967). High pH pre-treatment (priming) and subsequent inoculation to insect cell culture has been proved to be highly successful in spore germination (Kawarabata and Ishihara, 1984). In the gut of lepidopteron larva, the high pH of the gut juice provides the natural stimulus for *Nosema bombycis* spore germination. Germination studies of different microsporidians isolated from silkworm and other lepidopteran insects have been conducted at Silkworm Seed Technology Laboratory, Central Silk Board, Bangalore.

The germination response of the new microsporidia were studied and compared with the standard strain of *N. bombycis* by following neutralization method (Ohshima, 1937). The freshly purified spores of the new microsporidia and *N. bombycis* spores were incubated for 30 min in different concentrations of KOH solution (0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7% and 0.8%). The treated samples after incubation were neutralized with PBS (Phosphate buffered saline, pH 6.8) and were observed for germination of spores under phase contrast microscope. Germinated spores appeared black under phase contrast microscope and the thin polar filaments extruded from the spore with round sporoplasm at their tips were observed. % of germination calculated using method given by Undeen and Avery (1984) (Table I). The microsporidia which showed higher germination response tend to indicate more pathogenicity towards silkworms.

Table I. Germination performance of microsporidians.

Tableau I. Performance de germination des microsporidiens.

KOH Solution	<i>Nosema bombycis</i>	Microsporidian isolated from <i>Microsporidiens isolés de</i>							
		<i>N. bombycis</i>							
		Strain <i>Souche</i>		<i>Spilosoma obliqua</i>		<i>Pieris rapae</i>	<i>Telchinia violae</i>	<i>Eurema hecabe</i>	<i>Zizina otis</i>
		1	2	1	2				
0.05%	+++	++	+	++	-	+	--	+	--
0.1%	+++	++	+	++	-	+	--	+	--
0.2%	+++	+++	++	++	+	+	--	+	--
0.3%	+++	+++	++	++	+	+	--	+	--
0.4%	+++	+++	++	++	+	++	+	++	--
0.5%	+++	+++	++	++	+	++	+	++	--
0.6%	+++	+++	++	+++	+	++	+	++	+
0.7%	+++	+++	++	+++	++	++	+	++	+
0.8%	+++	+++	++	+++	++	+++	+	++	+

+++ : > 90%, ++ : 50-90%, + : < 50%

Life cycle of *Nosema bombycis*:

Several workers have studied the developmental cycle of *Nosema bombycis* in insect cell lines and have furnished comprehensive accounts of the life history employing light and electron microscopic techniques (Kawarabata and Ishihara, 1984; Iwano and Ishihara, 1991). The spores after entry into the midgut of the larva germinate under the influence of the alkaline conditions of the gut.

The polar tube is extruded with such force that it is directly placed inside an epithelial cell. The sporoplasm is infected into the cell through polar tube with its two nuclei. The sporoplasm is a diffuse type of simple cell with little cytoplasmic differentiation. The sporoplasm generally grows into a schizont which undergoes repeated schizogony. The daughter schizonts later enter into sporogony and produce sporonts. The sporonts have characteristic refractile spores. The genus *Nosema* is disporous and follows an apansporoblastic development in which the sporoblasts are not enclosed in a sporophorous vesicle. Each sporont divides and produces two spores. *Nosema bombycis* is dimorphic producing two distinct kinds of spores; one type which is pear-shaped and having fewer number of coils in the polar filament and another type which is typically oval having more number of coils in the polar treatment. The former type is responsible for cell to cell transmission of the parasite and spread infection in a single individual and the latter type which are excreted from an infected host, responsible for contamination and spread of infection from one host to another. The pyriform spores (short coiled spores) germinate spontaneously within a cell and release sporoplasm into adjacent cells which are referred to, as the secondary infective forms (SIF) (Kawarabata and Ishihara, 1984). These authors designated the sporoblasts as phase-I sporoplasts and phase-II sporoblasts depending on their stage of development. Phase-I sporoblasts are characterized by the presence of a dark staining spherical body. As the Phase-I sporoblasts develop into Phase-II sporoblasts, the spherical body gets rearranged and the contents of these sporoblasts are hardly stained with Giemsa. Finally, compact nuclei, which can be stained dark red with Giemsa are formed in the immature spores. Subsequent spore morphogenesis results in the formation of highly packed nuclei and more refractive cell wall.

Characteristics and symptoms of the disease:

The disease is characterized by certain very typical symptoms. The symptoms vary depending on the stage of silkworm development. The eggs laid by the pebrine infected moths are few in number and show very poor and irregular hatching. Heavily infected eggs are generally seen in lumps and are not glued to the egg cards firmly. They contain a high percentage of unfertilized and dead eggs. The infected larvae show poor appetite, retarded growth and development and irregular moulting resulting in disparity in size. As the disease progresses, the larvae appear pale and dull and generally shrink after moult. Due to chronic nature of the disease, the larvae do not die immediately and continue to be alive for a certain period. Black pepper like spots are also noticed on the skin of heavily infected larvae. The infected gut becomes opaque and white pustules appear on the silk glands. Pebrinised larvae generally die due to mechanical disruption of tissues and deprivation of the nutrients from the body. Infected pupae have swollen and blackish abdomen and occasionally black spots appear on this region (Ishihara, 1963). Heavily infected pupae fail to metamorphose to adult. Moth have deformed wings, distorted antennae and discoloured body. Infected moths do not exhibit typical mating behaviours and have very poor fecundity. Black spots are occasionally noticed on the wings and abdominal area and the moths appear dull. In pebrinised moths, the accessory glands are infected, resulting in moths laying loose eggs which easily roll off the egg sheets.

Incidence and prevalence in the field:

The survival of *Nosema bombycis* spores in the environment and seasonal incidence of pebrine is influenced by several factors. In tropical countries like India, Pebrine incidence is noticed to be high in the rainy and cooler seasons, probably due to the intensive silkworm crops raised in those seasons. It could also be due to the higher rate of survival of the spores in the field due to the moist conditions in those seasons. Survival of spores depends on the kind of material in which they are found in addition to the moisture content of the material (Maddox, 1973). The relationship of the disease epizootic with climatic conditions has been studied by several workers (Dasgupta, 1950; Jameson, 1922; Noamani *et al.*, 1971; Samson, *et al.*, 1990) and the results documented were highly variable. Jameson (1922) recorded a higher incidence of pebrine during August – September

commensurate with increased atmospheric moisture during that season. On the contrary, Noamani *et al.*, (1971) noticed higher intensity of pebrine during July – August, followed by November – December. These authors state that there is correlation between the incidence of disease and temperature or humidity. Some of the primary features involved in the disease initiation and development include the pathogen number, host population and an efficient means of transmission. These factors are however affected by abiotic factors (Tanada, 1963). The epizootic becomes more complex when the pathogen has a wide host range or the host is susceptible to infection by a group of distinct microsporidians. There are depressingly few long-term studies of protozoan epizootiology as a whole as also of Pebrine. It would be invaluable, to have more studies conducted over several years including infection levels, sources of contamination, pattern of spread host population densities, climatic factors, etc. Most of the available data about infection levels and host population densities were collected during the time when prevalence was high.

Silkworm seed production in India is laid down as per a three-tier system of multiplication in which the parent seed is sequentially multiplied from P4-P1 and subsequently F1 hybrid for commercial exploitation. Since 1991-1992, Silkworm Seed Technology Laboratory, Bangalore is conducting pebrine disease monitoring survey in seed areas of South India i.e., Karnataka, Andhra Pradesh and Tamil Nadu states covering different seasons i.e., summer, rainy and winter (Table II). Pebrine incidence has come to minimum level in the field. However, no definite trend in relation to season in any of the states was observed (Kamble *et al.*, 2005). The crop loss due to pebrine depends on the larval stage during which the contamination occurs in the rearing. The primary infection (occurring through transovarially infected silkworm eggs) generally results in total loss of the crop by the third instar. Infection occurring in the first and second larval instars results in crop loss affecting cocoon production. The infection in the later instars results in production of infected moths affecting seed production.

Sources of contamination:

Transovarially infected seed is the primary source of contamination in the field. Contaminated rearing room, rearing appliances and silkworm litter also contribute in no less degree to the spread of the disease. In an earlier study, Ishihara (1985) reported that the change of the epizootic pattern corresponded to the change in number of larvae excreting spores of *Nosema bombycis*. Microsporidians serologically related to *Nosema bombycis* and other species have been isolated from other lepidopterans collected from mulberry growing areas suggesting a possible route of contamination to silkworm crops (Kawarabata *et al.*, 1990).

Stage of contamination:

Contamination of pebrine occurs during any time in the larval stages. In the transovarial transmission, the pathogen passes through the eggs to the next generation. Low infections of the pathogen tend to pass unnoticed in one generation and gradually build up over generations (Singh *et al.*, 2006). The disease may pass unnoticed due to partial infection of the eggs also and the death of the infected larvae during early instars may also escape detection.

The larvae hatched from transovarially infected layings exhibit irregular growth and die in the rearing bed before 3rd moult. When healthy larvae are reared with the infected larvae secondary contamination takes place perorally. The contamination occurring from transovarially infected larvae is termed as first stage of contamination. The larvae thus perorally infected during 1st – 2nd instar show symptoms in late 4th or 5th instars and die before spinning. If the contamination takes place in the third instar, the larvae show symptoms in the late 5th instars and die on the mountage before cocooning. These larvae discharge spores through the faecal matter during the 4th & 5th instars. When the healthy larvae in the infected bed consume the spores along with the mulberry leaf, they get infected. This stage of contamination is known as second stage of contamination. The larvae infected in this manner spin normal cocoons and undergo eclosion but deposit transovarially infected eggs.

Table II. Season wise pebrine incidence at seed multiplication level in South India.

Table II. Incidence de la pébrine en fonction de la saison au niveau de la multiplication des graines dans le sud de l'Inde.

Year <i>Année</i>	Infection %		
	Summer season <i>Saison d'été</i>	Rainy season <i>Saison des pluies</i>	Winter season <i>Saison d'hiver</i>
KARNATAKA			
1991	*	31.98	*
#	*	*	*
1997	1.39	1.26	1.04
1998	0.40	0.55	0.20
1999	0.00	0.00	0.55
2000	0.00	0.10	0.06
2001	0.00	0.14	0.36
2002	0.00	0.00	0.20
2003	0.00	0.00	0.00
2004	*	*	*
2005	0.00	0.10	1.23
2006	0.09	-	-
TAMILNADU			
1991	*	21.61	*
1992	*	11.46	13.30
1993	4.17	3.64	8.09
1994	2.27	2.51	0.00
1995	0.85	5.48	3.33
1996	2.07	0.67	2.19
1997	0.67	1.20	0.00
1998	0.00	1.57	0.00
1999	0.00	0.00	0.44
2000	0.43	0.00	0.00
2001	0.00	0.00	0.00
2002	0.00	0.00	0.00
2003	0.00	0.00	0.00
2004	*	*	*
2005	1.35	0.00	0.00
2006	0.80	-	-
ANDHRA PRADESH			
1991	*	43.50	*
1992	47.83	30.36	9.04
1993	1.43	1.53	1.94
1994	0.00	0.00	0.00
1995	1.75	1.60	1.16
1996	1.37	0.00	0.00
\$	*	*	*
2003	0.00	0.00	0.00
2004	*	*	*
2005	0.00	0.00	0.00
2006	0.00	-	-

1992 - 1996 data not available / *données non disponibles*. \$ 1997 to 2002 data not available / *données non disponibles*. * data not available / *données non disponibles*.

Secondary contamination and spread of the disease:

Secondary contamination takes place normally from rearing rooms, appliances, mulberry garden and surface contaminated layings. In the rearing bed, contamination takes place through the faecal matter voided by infected larvae, contaminated tray, seat paper, dust from the contaminated room and larvae died due to the disease. The spores liberated from the above sources settle along with the dust on the mulberry leaf forming the source of secondary contamination in the rearing bed.

Improper and careless disposal of silkworm litter and infected larvae and use of incompletely decomposed silkworm bed refuse in mulberry fields may form potential sources of contamination. Surface contaminated eggs lead to transovum transmission of the disease. Also, if the layings are incubated in a contaminated room without proper disinfection, it could lead to surface contamination of eggs and in the process of hatching, the healthy larvae get infected. The larvae during the process of hatching bite the chorion leading to infection. The moth scales and urine are also other possible sources of surface contamination. Singh *et al.* (2002) reported that infected male moth of *B. mori* adversely affected the pairing efficiency, fecundity and hatching. The use of infected male moths for seed production also resulted in high level of contamination. When infected males are paired with uninfected female moth, venereal transmission of spores occurs, which ultimately leads to wrong diagnosis during mother moth examination (Patil *et al.* 2002) also confirmed the same findings regarding the role of infected males in venereal transmission of pebrine disease in *B. mori*.

Alternate host:

Several insect pests forms alternate host for microsporidians which induce epizootic in the primary host. Natural infection with microsporidians have been reported in several other lepidopterans i.e., *Pieris rapae*, *Spodoptera depravata*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura* and *Diaphania pulverulentalis*. 32 species of lepidopterous insects are known to develop infection to the peroral inoculation of the *N. bombycis* spores (Veber, 1958). The names include *Balataea funeralis*, *Cruptophlebia illepida*, *Exartema mori*, *E. morivirum*, *Diaphania pyloalis*, *Chilo suppressalis*, *Pieris brassicae*, *P. rapae*, *Mycalesis gotoma*, *Abraxas miranda*, *Descorba simplex*, *Boarmia selenia*, *Menophra atrilineata*, *Thaumetopoea procectionea*, *Malacosoma neustria*, *Gastropacha quercifolia*, *Lasiocampa quercus*, *Bombyx mandarina*, *Anthraea pernyi*, *A. Yamamai*, *Sphinx ligustri*, *Agrius cinagulatus*, *Phalera assimilis*, *Acronicta major*, *Arctomyia aceris*, *Achaea janata*, *Agrotis ipsilon*, *Elydna nonagrica*, *Otosema odera*, *Perigea illecta*, *Plusia chalcites*, *Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera mauritia*, *S. exigua*, *S. litura*, *Stilpnolia salicis*, *Lymantria dispar*, *Saturina pyri*, *Hyphantria cunea*, *Arctia caja*, *A. villica*, *Spilosoma lubricipeda*, *S. imparilis* and *Callimorpha quadripunctata* (Kawarabatta, 2003).

Cross infectivity:

Different insects harbouring in and around mulberry garden have been observed to carry microsporidians which are cross-infective to silkworms. Kishore *et al.*, (1994) have reported certain species of *Catopsilia* which are frequent visitors / inhabitants of the fields around mulberry gardens carry enormous quantity of spores of a microsporidian. This microsporidian was found to be infective to silkworms. Samson *et al.*, (1999a & b) also reported certain butterflies having microsporidians infective to silkworm. In the recent studies in Silkworm Seed Technology Laboratory, Bangalore has reported two butterflies i.e. *Eurena hecabae* and *Zizina otis* which contains microsporidian spores cross infective to silkworms. Further, *Spilosoma obliqua*, a mulberry pest also contains microsporidians spores which were found to be infective to silkworms. These insects are therefore a potential source of contamination in the silkworm rearing as they drop the spore of the pathogen on the mulberry leaves in the garden through scales and litter.

Immunological investigations:

Earlier, the identification of microsporidia was mainly based on the morphological characteristics, particularly the shape and size of the spore, the length of the polar filament, the number of coils observed with light and electron microscopy, but the dimorphism exhibited by microsporidians caused difficulties in accurate identification (Hazard and Weiser, 1968).

Identification of various microsporidians species was achieved using polyacrylamide gel electrophoresis (Fowler and Reeves, 1974a, 1974b) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Streett and Briggs, 1982). Later on immunological techniques have been used for detection of pathogens and species identification, *Nosema bombycis* and closely related species were diagnosed with the use of anti body sensitized latex (Hayashiya and Ayuzawa, 1987), the use of ELISA procedures (Kawarabata and Hayasaka 1987; Watanabe, 1987) and with fluorescent antibody technique (Sato *et al.*, 1981). Monoclonal antibodies have been also used for identification of specific microsporidians. Double immuno-diffusion techniques also were used to investigate the taxonomic relationship between different microsporidians (Knell and Zam, 1978). Langley *et al.*, (1987) has reported on an improved method of characterization of microsporidians spore proteins, using 2 - dimensional polysacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). This method increased the number of spore polypeptides resolved from *Nosema locustae* spore protein extracts 2 - 3 fold over 1 dimensional PAGE. Also, each of the 2D - PAGE spore protein fingerprints of the species examined, namely *Nosema locustae*, *Nosema bombycis* and *Vairimorpha nectar*, were unique and differences in their spore protein composition were easily determined. Baig *et al.*, 1992 found that protein-A linked latex antisera test (PALLAS) to be more sensitive than ordinary latex agglutination test. PALLAS test was observed to develop positive, clear, visible agglutination with a minimum spore of 1×10^6 spores per ml. Latex agglutination assay based on monoclonal antibodies (MCAs) for detection of pebrine infection in silkworm was found to be as effective as microscopic examination (Shamim *et al.*, 1997).

Vossbrinck *et al.*, (1987) suggested that the lineage leading to microsporidians branched very early from that leading to other eukaryotes based on Ribosomal RNA sequence. Norman *et al.*, (1996) suggested that *N. tricotylus* is a synonym of *N. bombycis* based on the sequence of the SSU-rRNA coding region. Monoclonal antibodies to *N. locustae* recognized the spore and extruded polar filament (Knoblett and Youssef, 1996). Malone and McIvor (1995) identified DNA fragments which hybridize specifically with DNA of *N. bombycis* and DNA of *N. costelytrae*, both fragments were AT-rich (59 and 79% of total bases, respectively), had G+C/A+T ratios of 0.70 and 0.25, respectively and represented repeated sequences dispersed throughout the genome. Elaine *et al.*, (2001) identified MAbs which could recognize some common microsporidians antigen (s) and may have utility in developing reagents for assays to detect microsporidia in insects.

The significance of these ultra structural differences was replaced after recent studies of phylogenetic relationships (Baker *et al.*, 1995; Hartskeerl *et al.* 1995; Leipe *et al.*, 1993; Hung *et al.* 1998). Phylogenetic reconstruction, based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) and comparison of SSU - rRNA sequences are now being used to classify and detect various micro-organisms (Cavalier - Smith and Chao 1996; Dugoured *et al.* 1996), including microsporidia (Kawakami *et al.* 1992; Vossbrinck *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 1994, 1995; Hung *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 1998; Hatakeyama *et al.*, 2000). Using RAPDs, Tsai *et al.*, (2003) has reported a phylogenetic relationship among different isolates of microsporidia infecting different lepidopteron pests.

The difficulties of proper identification of *Nosema* species, even when detailed studies on infection and extensive light and electron - microscopic examination are carried out, are well illustrated by Mercer and Wigley (1987), who could not distinguish a *Nosema* species that they had found in stem borer *Sceliodon cordalis* from 12 other *Nosema* species known to infect Lepidoptera. Early classification of microsporidia based on life-cycle features, spore size, shape and ultrastructure resulted in the unnecessary creation of new *Nosema* species. DNA technology is increasingly being used for the rapid diagnosis and characterization of non-cultivable, fastidious and slow growing micro-organisms (Tompkins, 1992; Olive and Bean, 1999; Garcia 2002).

Simple sequence repeats (SSRs) also called micro-satellites are tandem repeats of di, tri, tetra and penta-nucleotides, which are abundant and occur at multiple sites (Beckmann and Weber 1992; Wang et al. 1994; Field and Wills, 1996) in all eukaryotic genomes. The important feature of this class of repetitive DNA is its hypervariability, mainly expressed as a variation in the copy number of tandem repeats at a particular locus; it has been proven to be the most powerful genetic marker. Because of these short repeat length and the limited interaction of individual loci, they can be readily studied with PCR applications (Saghai Maroof et al., 1994; Moore et al. 1991; Schlotterer et al., 1991). Several PCR methods based on the amplification of rRNA gene fragments have been published for use in the diagnosis and species identification of insect microsporidia (Kawakami et al., 1995, 2001). Molecular techniques for the detection of spore appear to have high sensitivity and specificity (Hatakeyama and Hayasaka, 2001), Multiprimer PCR using several primers can be used for pebrine inspection of silkworm eggs (Hatakeyama and Hayasaka, 2003). Scientists of seed pathology division, Silkworm Seed Technology Laboratory, Central Silk Board, Bangalore, have isolated two new microsporidians from silkworms tentatively named as Strain-1 and Strain-2. Based on the results obtained by the RAPD – PCR analysis, these microsporidians are variants of *Nosema bombycis*.

Nageswara Rao et al., (2004) have studied the pathogenicity, mode of transmission, tissue specificity of infection and the small subunit rRNA (SSU-rRNA) gene sequences of the three new microsporidians isolates from the silkworm, *Bombyx mori*. Out of the three, NIK-2r revealed life cycle features and SSU-rRNA gene sequence similar to *Nosema bombycis*, suggesting that it is *N. bombycis*. The other two, NIK-4m and NIK-3h, differed from each other as well as from *N. bombycis*. NIK-4m was highly pathogenic and did not show any vertical transmission, in accordance with the apparent lack of gonadal infection, whereas NIK-3h was less pathogenic and vertical transmission was not detected but could not be excluded. Phylogenetic analysis based on SSU-rRNA gene sequence placed NIK-3h and NIK-4m in a distinct clade that included almost all the *Vairimorpha* species and *Nosema* species that infect lepidopteron and non-lepidopteron hosts, while NIK-2r was included in a clade containing almost all the *Nosema* isolates that infect only lepidopteron hosts. Nageswara Rao et al., (2005) has reported the genetic characterization and relationship among different microsporidia infecting the silkworm, *Bombyx mori*, using inter simple sequence repeat PCR (ISSR-PCR) analysis. Six different microsporidians were distinguished through molecular DNA typing using ISSR-PCR. Thus, ISSR-PCR analysis can be a powerful tool to detect polymorphisms and identify microsporidians which are difficult to study with microscopy because of their extremely small size. Of the 6 microsporidian isolates, NIK-1s revealed an SSU-rRNA gene sequence similar to *Nosema bombycis*, indicating the NIK-1s is similar to *N. bombycis*; the remaining 5 isolates, which differed from each other and from *N. bombycis*, were considered to be different variants belonging to the species *N. bombycis*.

FUTURE PROSPECTS

In the field of microsporidians, though lot of works have been done by the microsporidiologists, emphasis has to be given to the research on the epizootiological aspects of the disease. Because, a through knowledge of the epizooties of the microsporidiosis in silkworm, *Bombyx mori* L is an important prerequisite for management of the disease. Earlier, microsporidians identifications were mostly based light microscopy, electron microscopy and biochemistry. Subsequently serological techniques was developed as a important tool for diagnosis of the disease. Recently, scientists have suggested ISSR-PCR approach and valuable addition to methods, such as RAPD, RFLP and SSU-rRNA sequence analysis, to characterize and differentiate closely related microsporidian isolates from *B. mori*. Further, appropriate studies are required to diagnose the disease using developments in the field of bio-technology, which will be of great help to sericulture industry.

REFERENCES

- ABE Y., FUJIWARA T. (1979) Mode of multiplication of a protozoan, *Pleistophora* sp. (Microsporidia – Nosematidae) in the midgut epithelium of the silkworm larvae. *J. Seric. Sci. Jpn.* 48, 19-23.
- ANANTHLAKSHMI K. V. V., FUJIWARA T., DATTA R. K. (1994) First report on the isolation of three Microsporidians (*Nosema* spp.) from the silkworm, *Bombyx mori* L. in India. *Ind. J. Sericulture.*, 33(2):146-148.
- ANDREADIS T. G. (1987). Transmission. In: *Epizootiology of Insect diseases* (Fuza J R and Tanada Y. Eds), John – Willey and Sons, New York, pp 159-176.
- BAIG M., DATTA R. K., NATARAJU B., SAMSON M. V. SIVAPRASAD (1992) Protein-A linked latex antisera test for the detection of *Nosema bombycis* Naegeli spores. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 312-313.
- BAKER M. D., VOSSBRINCK C. R., DIDIER E. S., MADDOX J. V. SHADDUCK J. A. (1995) Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS related forms. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 564-570.
- BAKER M. D., VOSSBRINCK C. R., MADDOX J. V., UNDEEN A.H (1994) Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J. Invertebr. Pathol.* 64,100-106.
- BECKMANN J. S., WEBER J. C. (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12, 627-631.
- BROOKS W. M. (1988) Entomogenous protozoa. in “*Handbook of Natural Pesticides*”. Etd. C. M. Ignoffo, Vol. 5, pp. 1-149. CRC Press, Inc. Boca Rota, Florida.
- CALI A. (1971) Morphogenesis in the genus *Nosema*. *Paroc. Fourth Int. Collog. Insect. Pathol.* pp.431-438. College Park. Maryland, Aug. 25-28, 1970.
- CANNING E. U. (1990) Phylum Microspora. “*Handbook of Protozoists*” (L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, D. Chapman, and J. Jones Ed.) pp 53-72.
- CANNING E. U., BRAKER R. J., PAGE A. M., NICHOLAS J. P. (1985) Transmission of microsporidia, especially *Othosoma opuspherae* (Canning, 1960) between generations of winter moth *Operophtera brumata* (L.) (Lepidoptera:Geometridae). *Parasitology*, 90,11-19.
- CAVALIER-SMITH E., CHAO T. E. (1996) Molecular phylogeny of the free living archezoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *J.Mol. Evol.* 43, 551-562
- CHITRA C., KARANTH G. K., VASANTHARAJAN V. N. (1975) Diseases of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Scient. Ind. Res. Vol.* 34, 386-401.
- DASGUPTA M. R. (1950) Monograph on cottage Industries No.1. Diseases of silkworm. Govt. press. Calcutta, India p.9.
- DUGOURD D., JACQUES M., BIGRAS-POULIN M., HAREL, J (1996) Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 by random amplification of polymorphic DNA analysis *Veter. Microbiol.* 48, 305-314.
- EDLIND T. D., LI J., VISVESVARA G. S., VODKIN M. H., MC LAUGHLIN G. L., KATYAR S. K. (1996) Phylogenetic analysis of betetubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 359-367.
- ELAIN M. K., PETER M. T., ANN CALI, HERBERT B., MURRAY W., W. LOUIS M. (2001) Monoclonal antibodies to cytoplasmic Antigens of *Nosema locustae* (microsporidia : Nosematidae) *J. Invertebr Pathol.* 77: 81-82.
- FAST, M. NLOGSDON JR., J. M., DOOLITTLE F. W. (1999). Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from *Nosema locustae*: Evidence for a microsporidia – fungi relationship and splicesomal intron loss. *Mol. Biol. Evol.* 16,1415-1419.
- FIELD D., WILLS C. (1996) Long polymorphic micro-satellites in simple organisms. *Proc. R. Soc. B.* 263, 209-215.
- FOWLER J. L., REEVES E. L. (1974a) Detection of relationships among microsporidian isolates by electrophoretic analysis, hydrophobic extracts. *J. Invertebr. Pathol.* 23; 3-12.

- FOWLER J. L., REEVES E. L. (1974b) Detection of relationships among microsporidians isolates by electrophoretic analysis, hydrophobic extracts. J. Invertebr. Pathol. 23, 63-69.
- FUJIWARA T. (1980) Three Microsporidians (*Nosema sp.*) from Silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan. 49 (3), 229-236.
- FUJIWARA T. (1984a) A pleistophora like microsporidians isolated from the silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan. 53 : 398-402.
- FUJIWARA T. (1984b). *Thelophania sp.* (Microsporida: Thelohaniidae) isolated from Silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan. 53 ,459 - 460.
- GARCIA L. S. (2002) Laboratory identification of the microsporidia. J. Clin. Microbiol. 40, 1892-1901
- GHOSH C.C. (1949) In "Silk Production and Weaving in India". CSIR Monograph, India. Govt. printing press, Calcutta.
- HARTSKEERL R. A., VANGOOL T., SEHUITEMA A. R., DIDIERE S., TERPSTRA W. J. (1995) Genetic and immunological characterization of the microsporidians *Sepata intestinalis* Cali, Kotter and ovenstein 1993; reclassification to *Encephlitozoon intestinalis*. Parasitology, 110,277-285.
- HATAKEYAMA Y., HAYASAKA S. (2001) Specific amplification of microsporidia DNA fragments using multiprimer PCR J. Seric. Sc. Jpn. 70, 163-166.
- HATAKEYAMA Y., HAYASAKA S. (2003) A new method of pebrine inspection of silkworm eggs using multiprimer PCR. J. Invertebr. Pathol 82(3), 148-151.
- HATAKEYAMA Y., BANSAL A. K., IWANO H., KAWAKAMI Y., ISHIHARA R. (2000). Characterization of SSU-rRNA sequence of a new microsporidium *Nosema sp.* (Nosematidae : Microsporidia), isolated from *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae) in India. Indian J. Seric. 39,131-134.
- HAYASAKA S., AYUZAWA C. (1987) Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* and closely related species by antibody sensitised latex J. Seric. Sci. Japan. 56, 169-170.
- HAZARD E. I., WEISER J. (1968) Spores of *Thelohania* in adult female *Anopheles*: Development and transovarial transmission, and redescription of *T. legeri* Hesse and *T. obesa* Kudo. J. Protozool. 15,817-823.
- HIRT R. P., HEALY B., VOSSBRINCK C. R., CANNING E. U., EMBLEY T. M. (1997) Amitochondrial Hsp70 Orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. Curr. Biol. 7, 995-998.
- HIRT R. P., LONGSDON JR J. M., HEALY B., DOREY M. W., DOOLITTLE W. F., EMBLEY T. M. (1999) Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96,580- 585.
- HUGER A. (1960) Electron microscope study on the cytology of a microsporidians spore by means of ultrathin sectioning. J. Insect. Pathol. 2, 84-105.
- HUNG H.W., LOC F., TSENG C.C., PENG S.E., CHOW C.M., KOM G.H. (1998) The small subunit ribosomal RNA gene sequence of *Pleistophora anguillarum* and the use of PCR primers for diagnostic detection of the parasite. J. Eukaryot. Microbiol. 45, 556-560
- ISHIHARA R. (1967) Stimuli causing extrusion of polar filaments of *Glugea fumiferanae* spores. Canadian J. Microbiol. 13,1321-1332.
- ISHIHARA R. (1963) Effect of infection of *Nosema bombycis* Naegeli on the pupal development of the silkworm *Bombyx mori* (Linnaeus). J. Insect Pathol. 14,316-320.
- ISHIHARA R. (1969) The life cycle of *Nosema bombycis* as revealed in tissue culture cell of *Bombyx mori* J. Invertebr. Pathol. 14, 316-320.
- ISHIHARA R. (1985) Researches in pebrine for the past twenty years. J. Seric. Sci. Jpn. 54, 347-353.
- ISSI I. V. (1986) Microsporidia as a phylum of parasitic protozoa. Acad. Sci U.S.S.R. "Protozoology" (Leningrad) 10,6-136 (In Russian with English summary).
- IWANO H., ISHIHARA R. (1991) Dimorphism of spores of *Nosema sp.* in cultured cell. J. Invertebr. Pathol. 57, 211-219.
- JAMESON P.A. (1922) Report on the diseases of silkworms in India, Govt. Printing Press, Calcutta, India.

- KAMBLE C. K., MAGADUM S. B., SINGH R. N., K. DANIEL A. G., MANJULA A. (2005) Incidence of pebrine in *Bombyx mori* L at seed multiplication levels in South India and its management – A review. in 20th International sericultural commission 15th -18th Dec. 2005, Bangalore, India, pp: 241-244
- KAWAKAMI Y., INOUE T., KIKUCHI M., TAKAYANAGI M., SUNAIRI M., ANDO T., ISHIHARA R. (1992) Primary and secondary structures of 5S ribosomal RNA of *Nosema bombycis*. (Nosematidae : Microsporidia). J. Seric. Sci. Jpn, 61,321-327.
- KAWAKAMI Y., INOUE T., UCHIDA Y., HATAKEYAMA Y., IWANO H., ISHIHARA R. (1995) Specific amplification of DNA from reference strain of *Nosema bombycis*. J. Seric. Sci. Jpn. 64, 165-172.
- KAWAKAMI Y., IWANO H., HATAKEYAMA Y., INOUE T., CANNING E. U. ISHIHARA R. (2001) Use of PCR with the specific primers for discrimination of *Nosema bombycis*. J. Seric. Sci. Jpn, 70, 43-48.
- KAWARABATA T. (2003) Review – Biology of microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori* in Japan J. Insect Biotechnology and Sericology, 72,1-32.
- KAWARABATA T., HAYASAKA A., ICHIDA M., SEGAWA H., TERAMINE T., UEMATSU H., YASUDA K. (1990) Detection of microsporidians in adults of the cabbage worm, *Pieris rapae crucivora* collected from mulberry fields. J. Seric. Sci. Jpn. 59,288-292.
- KAWARABATA T., HAYASAKA S. (1987) An enzyme linked immunosorbent assay to detect alkali soluble spore surface antigens of strains of *Nosema bombycis*. J. Invertebr. Pathol. 50, 118-123.
- KAWARABATA T., ISHIHARA R (1984) Infection and development of *Nosema bombycis* (Microsporidia : Protozoa) in a cell line of *Antheraea eucalypti*. J. Invertebr. Pathol. 44, 52-62.
- KEELING P. J., DOOLITTLE W. F. (1996) Alpha tubulin from early diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family Mol. Biol. Evol. 13,1297-1305.
- KISHORE S., BAIG M., NATARAJU B., BALAVENKATASUBBAIAH M., SIVAPRASAD., IYENGAR M. N. S., DATTA R. K. (1994) Cross-infectivity of Microsporidians isolated from wild lepidopteron insects to silkworm, *Bombyx mori* L. Ind. J. Seri., 33(2) ,126-130.
- KNELL J D., ZAM S G. (1976) A serological comparison of some species of microsporidia. J. Invertebr. Pathol. 31,280-288.
- KNOBLETT J. N., YOUSSEF N. N. (1966) Detection of *Nosema locustae* (Microsporidia: Nosematidae) in frozen grasshoppers (Orthoptera : Acridae) by using monoclonal antibodies. J. Econ. Entomol. 89(4), 841-847.
- KRAMER J. P. (1976) The extra corporeal ecology of Microsporidia. In comparative pathobiology Vol. 1 Ed. By Bulla Lee A. Jr. and Cheng T C, Plenum Press, ISDA, Manhattan, Kanswa, USA, pp 127-135.
- LANGLEY R.C. Jr., CALI A., SOMBERG E. W. (1987) Two dimensional electrophoretic analysis of spore proteins of the microsporidia J. Parasitol. 73(5),910-918.
- LARSSON R. (1986) Ultra structure, function and classification of microsporidia. Progr. Protistol, 1, 325-380.
- LEIPE D. D., GUNDERSON J. H., NERAD T. A. SOGIN M. L. (1993) Small subunit ribosomal RNA of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. Mol. Biochem. Parasit. 59, 41-48.
- MADDOX J. V. (1973) The persistence of the microsporidians in the environment. Entomol. Sci. Amer. Misc. Publ. 9, 99-104.
- MALONE L. A., MCLVOR C. A. (1995) DNA probes for two microsporidia *Nosema bombycis* and *Nosema costelytrae*. J. Invertebr. Pathol. 65(3): 269-273.
- MAURAND J., LOUBIS C. (1973) Recherches cytochimiques sur quelques microsporidies. Bull. Sc. Zool. Fr. 98, 373-383.
- MERCER C. F., WIGLEY P. J. (1987) A microsporidians pathogen of the poroporo stem borer, *Sceliodon cordalis* (Dblid) (Lepidoptera: Pyralidae). J. Invertebr Phathol. 49, 93-101.

- MOORE, S. S., SARGEANT L. L., KIND T. J., MATTICK J. S., GEORGES M., HETZEL D. J. S. (1991) The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allow the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10, 654-660.
- MUKERJEE N. G. (1919) Handbook of Sericulture. Bengal Secretariat Book Depot, Calcutta, India.
- NAEGELI A., (1857) Ueber die neue krankheit der seidenraupe and verwandte organismen. *Bot. Zt.* 15, 760-761.
- NAGESWARA RAO, S., MUTHULAKSHMI M., KANGINAKUDRU S., NAGARAJU J. (2004) Phylogenetic relationships of three new microsporidians isolates from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr Phathol.* 86: 87-95.
- NAGESWARA RAO, S., SURENDRA NATH B. SARATCHANDRA B. (2005) Characterization and phylogenetic relationships among microsporidia infecting silkworm, *Bombyx mori*. Using inter simple sequence repeat (ISSR) and small subunit rRNA (SSU-rRNA) sequence analysis. *Genome*, 48, 355-366.
- NOAMANI M. K. R., KRISHNASWAMI S. SAHAKUNDU A. K. (1971) Observation on the seasonal incidence and intensity of Pebrine disease of the silkworm, *Bombyx mori* L under West Bengal climatic conditions *Ind. J. Seric.* 9,101-104.
- NORMAN J. P., ALEXANDREDA SILVA J., SUSAN B. S., GOVINDA S., VISVESVARATIMOTHY, J. K., CHISA YASUNAGA (1966) *Nosema trichoplusiae* is a synonym of *Nosema bombycis* based on the sequence of the small subunit Ribosomal RNA coding region. *J. Invertebr Phathol.* 67,316-317.
- OHSHIMA K. (1937) On the function of the polar filament of *Nosema bombycis*. *Parasitology*, 29: 220-224
- OHSHIMA K. (1964) Effect of potassium ion on filament evagination of spores of *Nosema bombycis* as studied by the neutralization method. *Annot. Zool. Jpn.* 37, 102-103.
- OLIVE D., BEAN M. P. (1999) Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms *J. Clin. Microbiol.* 37, 1661-1669.
- PASTEUR L., (1870) Etudes sur la maladie des vers a soie. P-322. Gauthier – Villars, Imprimeur – Libraire, Paris.
- PATIL C. S. (1993) Review on pebrine, a microsporidians disease in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 33(2), 201-210.
- PATIL C. S., JYOTHI N. B. DAS M. S. (2002) Role of *Nosema bombycis* infected male silk moths in the venereal transmission of pebrine disease in *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *J. Appl. Ent.*, 126, 563-566.
- RAYNAUD L., DELBAC F., BROUSSOLLE V., RABODONIRINA M., GIRAULT V., WALLON M., COZON G., VIVARES C. P. PEYRON F. (1998). Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travellers with chronic diarrhoea by specific PCR amplification *J. Clin. Microbiol.* 36, 37-40.
- SAGHAI-MAROOF A. M., BIYASHEV R. M., YANG G. P., ZHANG Q., ALLARD R. W. (1994) Extra ordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,5466-5470.
- SAMSON M. V., SANTHA P. C., SINGH R. N., SASIDHARAN T. O. (1999a) A new Microsporidian infecting *Bombyx mori* L. *Indian Silk*, Vol. 37(10),10-12.
- SAMSON M. V., SANTHA P. C., SINGH R. N., SASIDHARAN T. O. (1999b). Microsporidian spore isolated from *Pieris* sp. *Indian Silk*, Vol. 38(7), 5-8.
- SASIDHARAN T. O., SINGH R. N., SAMSON M. V., MANJULA A., SANTHA P. C. CHANDRASEKHARAI AH (1994) Spore replication rate of *Nosema bombycis* (Microsporidia: Nosematidae) in the silkworm *Bombyx mori* L. in relation to pupal development and age of moths. *Insect. Sci. Applic.* 15 (4/5): pp.427-431.
- SATO R., KOBAYASHI M., WATANABE H., FUJIWARA T. (1981) Serilogical discrimination of several kinds of microsporidian spores isolated from the silkworm, *Bombyx mori* by an indirect fluorescent antibody test. *J. Seric. Sci., Japan* 50, 180-184.

- SATO R., KOBAYASHI M., WATANABE H. (1982) Internal ultrastructure of spores of microsporidians isolated from the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Invertbr. Pathol. 40,260-265.
- SCHLOTTERER C., AMOS B., TAUTZ D. (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. Nature. 354, 63-65.
- SHAMIN M., GHOSH D., BAIG M., NATARAJU B., DATTA R. K., GUPTA S. K. (1997) Production of monoclonal antibodies against *Nosema bombycis* and their utility for detection of Pebrine infection in *Bombyx mori* L. J. Immunoassay 18(4), 357-370.
- SINGH R. N., DANIEL A. G. K., SANTHA P. C., KAMBLE C. KMAGADUM, S. B. SASIDHARAN T. O. (2006) Impact of low pebrine infection in *B. mori* through successive generations. Indian Silk vol. 45(2), 9-10.
- SINGH R. N., SASIDHARAN T. O., SANTHA P. C., VEERIAH T. M. MANJULA A. (2002) Silkworm seed production: Is use of pebrinised male moths safer ?. Indian Silk, 41(5), 9-10.
- SPRAGUE V. (1977) Classification and phylogeny of the microsporidia. In comparative Pathobiology Vol. 2. Systematics of the Microsporidia. Plenum Press 510 p.
- SPRAGUE V. (1982). Microspora. In synopsis and classification of living organisms, Mc Graw Hill, New York, Vol.1, pp.589-594.
- STREETT D. A., BRIGGS J. D. (1982) An evaluation of sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis for the identification of microsporidia. J. Invertebr. Pathol. 40,159-165.
- TANADA Y. (1963) Epizootiology of infectious diseases. In : Insect Pathology, Ed. By E.A. Steinhaus, Vol. II, pp. 423-475. Academic Press, New York.
- TOMPKINS L. S. (1992) The use of molecular methods in infectious diseases N. Engl. J. Med. 327, 1290-1297.
- TSAI S. J LO., C. F., SOICHI Y., WANG C. H. (2003) The characterization of microsporidian isolates (*Nosematidae*: *Nosema*) from five important lepidopteran pests in Taiwan. J. Invertebr. Pathol. 83, 51-59.
- UNDEEN A. H. (1978) Spore-hatching processes in some *Nosema* species with particular reference to *Nosema algerae* Vavra and Undeen. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 11, 29-50.
- UNDEEN A. H. (1990) A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. J. Theoret. Biol. 142: 223-235.
- UNDEEN A. H. & AVERY, S. W. (1984). Germination of experimentally nontransmissible microsporidia. J. Invertebr. pathol., 43: 299-301.
- VAVRA J. (1976). Structure of the Microsporidia. "Comparative Pathobiology Vol. 1. The Biology of the Microsporidia" (L. A. Bulla and T. C. Cheng, Ed.) pp 1-86. Plenum Press, New York.
- VEBER J. (1958) A comparative histopathology of the microsporidians *Nosema bombycis* on different hosts. In Transactions of the first International Conference of Insect Pathology and Biological control, p. 301-314, Praha.
- VOSSBRINEK C. R., MADDOX J. V., FRIEDMAN S., DEBRUNNER-VOSSBRINEK C. WOESE R. (1987) Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature 326, 411-414.
- VOSSBRINEK C. RBAKER., M. D., DIDIER E. S., DEBRUNNER-VOSSBRINEK B. A. SHADDUCK J. A. (1993) Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. J. Eukaryot. Microbiol. 40, 354-362.
- WANG Z., WEBER J. L., ZHONG G., TANKSLEY S. D. (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88, 1-6.
- WATANABE H. (1987) The host population, In : epizootiology of Insect diseases (Fuxa J R and Tanda Y. Eds), Wiley - Inter science, New York, pp: 71-72.
- WEISER J. (1977) Contribution to the classification of microsporidia. Vestn. Cesk. Spol. Zool. 41: 308-321.
- WEISS L. M., VOSSBRINEK C. R. (1999) Molecular biology to the microsporidia. In the Microsporidia and Microsporidiosis. P: 129-171, ASM Press, Washington D C.
- WITTNER M. (1999) Historic perspective on the microsporidia : Expanding horizons. In the Microsporidia and Microsporidiosis. P: 1-6, ASM Press, Washington D C.

REVUE SUR LES MICROSPORIDIENS INFESTANT LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

R. N. SINGH, A. G. K. DANIEL, S. S. SINDAGI & C. K KAMBLE

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmelram post, Kodathi, Bangalore – 560 035, Inde.

*On a compris depuis longtemps que la microsporidiose des vers à soie est provoquée par un microsporidien parasitaire très virulent, **Nosema bombycis** Naegeli. Depuis, on a isolé différentes souches et espèces sur les vers à soie infestés et l'épizootie de la maladie est devenue de plus en plus complexe, au fur et à mesure qu'on identifie un nombre de plus en plus important de souches et d'espèces qui infestent le ver à soie. Elle diffère des autres maladies du ver à soie, car elle est transmise à la fois horizontalement et verticalement. Il est primordial de recueillir et de rassembler les informations relatives à la pébrine, de manière à aider les chercheurs à mettre au point une méthode de lutte efficace contre la maladie. Dans cette optique, nous avons donc essayé de passer en revue la littérature sur les microsporidiens qui infestent le ver à soie, **Bombyx mori** L.*

INTRODUCTION

Les microsporidiens sont un groupe de différents protozoaires amitochondriaux parasites obligés qui forment des spores ; ils comprennent plus de 1200 espèces, appartenant à 143 genres (Weiss et Keohane, 1999 ; Hoffman et coll., 2003). Les microsporidies sont des eukaryotes avec un noyau distinct et une enveloppe nucléaire, mais elles n'ont pas de centrioles ou de mitochondries et sont considérées comme uniques parmi les eukaryotes, parce que la petite sous-unité de leur ARN ribosomique (SSU-r ARN) est plus petite que celle des eukaryotes typiques (Vossbrinck et coll., 1993). Les analyses récentes effectuées sur la tabuline, l'ARNr et l'Hsp70, confirment la classification des microsporidies à l'intérieur des champignons (Edlind et coll., 1996 ; Keeling et Doolittle, 1996 ; Fast et coll., 1999 ; Hirt et coll., 1997, 1999). On sait que ces organismes sont pathogènes pour un grand nombre d'animaux hôtes, dont les insectes, les poissons et les mammifères. *Nosema bombycis* (Naegeli, 1887) est le pathogène le plus redouté du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori*, il provoque la maladie de la pébrine, qui a dévasté l'industrie de la soie en France au milieu du 19^{ème} siècle. Pasteur (1870) a identifié la cause de la maladie et également proposé une méthode de lutte. Abe et Fujiwara (1979) ont étudié le mode de multiplication de *Pleistophora* sp. dans l'épithélium de l'intestin moyen du ver à soie. Sasidharan et coll., (1994) ont étudié la multiplication des spores de *Nosema bombycis* dans différents tissus du ver à soie, *Bombyx mori*. Sato et coll., (1981) ont étudié la discrimination sérologique de plusieurs types de spores microsporidiennes, isolées sur *B. mori*, en utilisant une technique d'anticorps fluorescents indirecte. Sato et coll., (1982), ont déterminé que M12 de *Nosema* n'est pas vraiment *Nosema* mais une souche de *Vairimorpha* sur la base de la structure de la spore. Hayasaka et Ayuzawa (1987) ont suggéré une méthode de diagnostic en utilisant un latex sensibilisé à l'anticorps, pour identifier *N. bombycis* et les espèces étroitement apparentées. Baker et coll., (1994) ont étudié la relation phylogénétique entre *Vairimorpha* et *Nosema* sp. en utilisant les données de la séquence de l'ARNr. Baker et coll., (1995) ont étudié la relation phylogénétique entre plusieurs genres de microsporidiens en utilisant la similarité de séquence d'une petite sous-unité de l'ADN ribosomique (SSU-r ADN). Hatakeyama et coll., (2000) ont utilisé le séquençage des SSU-r de l'ARN pour étudier la position systématique des microsporidiens isolés sur *Antheraea mylitta* et

constaté qu'ils sont très proches de *N. bombycis*, mais différent beaucoup de *Vairimorpha*, d'*Encephalitozoan* et de *Plestophora*. Parmi les 1000 espèces dénommées de microsporidies, on en a rapporté environ 600 sur les insectes et le nombre exact d'espèces décrites est compris entre 900 et 1300 (Sprague et Beene, 1999). On a enregistré le premier rapport sur la présence de la maladie de la pébrine en 1859 dans la province du Bengale en Inde et par la suite l'incidence de pébrine a été intermittente dans différentes parties de l'Inde.

La lutte contre la pébrine continue depuis plus d'un siècle mais les pertes provoquées par cette maladie n'ont pas complètement disparues. Dans cette revue, nous avons donc essayé de mettre en évidence les différents aspects des études sur les microsporidiens du ver à soie réalisées par les scientifiques.

Classification :

La taxonomie des microsporidies a subi plusieurs révisions au cours des dernières décennies. Récemment, en reconnaissant le caractère unique des microsporidies, plusieurs protozoologistes ont élevé ces organismes au niveau d'un Phylum différent des Microsporidia ou Microspora (Weiser, 1977 ; Sprague, 1977 ; 1982 et Issi, 1986). Aujourd'hui, la plupart des microsporidiologues suivent le système mis au point par Sprague (Brooks, 1988 ; Canning, 1990). En général, à l'heure actuelle tous les chercheurs sont d'accord pour reconnaître le groupe comme un Phylum différent. La classification de certains genres sous la classe des Microspora (par exemple *Nosema*, *Perezia*, *Glugea* et *Encephalitozoan*) a considérablement changé. En 1905, Pirez a redéfini le genre *Nosema* et introduit le terme " monospore " qui a été interprété par les chercheurs suivants comme signifiant la spore dérivée d'un sporonte. Cela a entraîné la confusion pendant près d'un demi-siècle. Chez *Nosema bombycis*, l'espèce type, le sporonte donne naissance à deux spores (Ishihara, 1969 ; Cali, 1971).

Le genre *Nosema* contient le plus grand nombre d'espèces et représente un groupe hétérogène dont beaucoup d'espèces devront être retirées pour être classées dans d'autres genres. La taxonomie des genres et des espèces de microsporidiens se base sur les différences de morphologie, de cycle de vie et de relations parasite – hôte. A l'heure actuelle, on considère, en général, que dans plusieurs cas, elles ne sont pas adaptées et on a reconnu qu'on aurait besoin d'autres critères comme l'analyse biochimique et la sérologie.

Les récentes études de génétique moléculaire sur les microsporidiens ont considérablement changé la taxonomie et la phylogénie traditionnelles des microsporidies. Vossbrinck et coll., (1987) ont montré que le codage de la séquence génomique pour la petite sous-unité d'ARN ribosomique 16 S (ARN SSU-r) d'un microsporidien d'insecte *Vairimorpha necatrix* diffère énormément de celles d'homologues chez d'autres eukaryotes. Katinka et coll., (2001) ont rapporté la séquence ADN de 11 chromosomes sur le génome de 2,9 mega base (Mb) chez un pathogène de mammifère, *Encephalitozoan cuniculi*, y compris 1997 gènes potentiels codant pour des protéines. Récemment, les études de phylogénie moléculaire des microsporidies ont identifié plusieurs gènes, y compris ceux de l'Hsp70 mitochondrial, des α - β tubulines ainsi que des facteurs d'allongement de la traduction, ce qui suggère qu'il existe une ressemblance étroite entre les microsporidies et les champignons (Weiss et Vossbrinck, 1999 ; Wittner, 1999).

Position systématique de *Nosema bombycis* (Sprague, 1979) :

Phylum :	Microspora
Classe :	Microsporea
Ordre :	Microsporida
Sous-ordre :	Apanosporoblastina
Genre :	<i>Nosema</i>
Espèce :	<i>Nosema bombycis</i>

Histoire de la maladie :

La microsporidiose du ver à soie est provoquée par un microsporidien parasite très virulent, *Nosema bombycis*. De manière intéressante, le premier microsporidien à avoir été nommé est *Nosema bombycis* Naegeli en 1857. On l'a découvert comme l'agent étiologique de l'épidémie de la pébrine du ver à soie qui s'est produite en Europe au milieu du dix-neuvième siècle et qui a attiré l'attention de nombreux scientifiques éminents. Plus tard, à la fin du 19^{ème} siècle, la maladie s'est propagée dans les pays séricicoles en Europe, ce qui a entraîné le déclin total de la production de soie.

L'illustre microbiologiste français, Louis Pasteur (1870) a été le premier à réaliser une étude détaillée sur la croissance et la multiplication du pathogène. Il a été le premier à détecter la transmission de la pébrine par l'œuf et à proposer l'examen du papillon mère pour produire des graines de vers à soie saines. En Inde, de nouvelles recherches sur différents aspects de la maladie ont été réalisées par Mukherjee (1919), Jameson (1922) et Ghosh (1949).

Sous les tropiques, la pébrine est couramment répandue en Thaïlande, au Cambodge, au Vietnam, etc... L'incidence est élevée dans les pays où les fermiers produisent leurs propres graines de vers à soie. La première observation de la présence importante de pébrine en Inde a eu lieu au 19^{ème} siècle, quand l'épidémie a balayé le Cachemire. En 1890-1900, la maladie est apparue à une échelle épidémiologique dans les provinces de Mysore et de Madras de l'époque. Puis, elle est réapparue en 1925-30 sous la forme d'une épizootie (Chitra et coll., 1975). Lefroy (1976) en a conclu que la pébrine était probablement présente au Bengale dès 1875 et à Mysore entre 1890 et 1900, ce qui a entraîné de fréquents échecs des récoltes dans ces régions à cette époque. Dans la zone de grainage de Mysore, on a observé l'éruption de la maladie en 1940-47. Depuis, des éruptions périodiques ont lieu. Dans certaines zones du sud de l'Inde, l'épidémie de maladie s'est produite en 1991-1992, ce qui a entraîné une perte importante de récoltes et de revenus pour l'état. C'était pour la première fois de l'histoire de la sériciculture dans le sud de l'Inde, que l'on observait une incidence anormalement élevée de pébrine à tous les niveaux de base de la multiplication des graines, y compris au niveau de l'élevage du ver à soie commercial. Plus tard, on a remarqué l'incidence de la maladie de manière intermittente dans les récoltes du sud de l'Inde et également dans d'autres parties du reste de l'Inde.

Microsporidiens du ver à soie :

En plus de *Nosema bombycis*, on a isolé des microsporidiens qui appartiennent au genre *Nosema*, *Pleistophora* et *Thilohania* sur le papillon du ver à soie (Fujiwara, 1984a, b). Ces microsporidiens diffèrent de par leur morphologie, de par leurs tissus cibles et de par leur virulence et on les a désignés M11, M12 et M14 (*Nosema* sp.) ; M24, M25 et M27 (*Pleistophora* sp.) et M32 (*Thilohania* sp.). Au Karnataka, on a isolé trois microsporidiens désignés comme NIK-2r (*Nosema* sp., Mysore), NIK-3h (M11 de *Nosema* sp., Hassan) et NIK-4M (spore M12 de *Nosema*, Mysore) et ils sont dissemblables de *Nosema bombycis* sur le plan immunologique (Ananthakakshmi et coll., 1994a). Récemment, les scientifiques du Département de Pathologie des Graines, du *Silkworm Seed Technology Laboratory*, du *Central Silk Board* à Bangalore ont isolé deux nouveaux microsporidiens de vers à soie, nommés à titre d'essai Souche 1 et Souche 2. Ces microsporidiens sont différents de la souche standard de *Nosema bombycis* d'après leurs aspects morphologiques et pathologiques.

Mode d'infestation et de transmission :

Tous les microsporidiens sont des parasites intracellulaires à la grande capacité reproductive et se caractérisent par la possession de spores, à parois épaisses, contenant un filament polaire et un agent infectieux ou sporoplasme. Les microsporidies envahissent les insectes par ces portails d'entrée naturels : oral, cuticulaire et ovarien (Kramer, 1976). L'entrée par le portail oral et cuticulaire entraîne la transmission horizontale et par le portail ovarien, une transmission verticale. Le portail oral est la route la plus courante par lesquelles les spores mûres des microsporidiens gagnent les tissus hôtes, comme dans le cas de *Nosema bombycis* qui infeste les vers à soie ou de *Nosema apis* qui infeste le

tube digestif des abeilles adultes. La transmission par les excréments contaminés avec des spores se produit couramment chez les hôtes sensibles (Andreadis, 1987). Dans le mode de transmission ovarien qui se produit avec *Nosema bombycis*, le pathogène est incorporé dans l'œuf ou dans l'embryon à l'intérieur de l'appareil reproductif de la femelle et la descendance de ces femelles infestées est également infestée. Dans certains cas, bien que le microsporidien soit à l'intérieur de l'œuf, il ne se produit pas de transmission transovarienne. Dans un cas enregistré, chez le papillon hivernal *Operophtera brumata* (Lepidoptera), l'embryon à l'intérieur de l'œuf n'est pas infesté mais par la suite, la larve devient infestée, quand les spores des microsporidiens sont ingérées avec le reste du vitellus lorsque la larve sort en mangeant la coquille de l'œuf (Canning et coll., 1985). L'infestation est donc similaire à celle des larves qui se nourrissent sur des spores contaminant la surface de la coquille de l'œuf.

Caractéristiques morphologiques et ultrastructurales de la spore :

La structure la plus distincte, unique et compliquée du microsporidien est la spore qui est le stade infectieux du pathogène. C'est probablement la plus petite cellule eukaryote. C'est le seul stade du cycle de vie du pathogène, où il est capable de survivre à l'extérieur de l'hôte. Il a un appareil d'expulsion du sporoplasme caractéristique, qui inclut le filament polaire. Cet appareil est uniquement utilisé pour l'inoculation du sporoplasme dans l'hôte. En général, la spore manque de substances de réserves (Maurand et Loubis, 1973). Elles manquent aussi de mitochondries. En gros, la spore a trois composants c'est à dire le sporoplasme, l'appareil d'expulsion et l'enveloppe de la spore.

Une spore mûre est ovale ou ovocylindrique et mesure approximativement $3,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de longueur et $2,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de largeur. Leur taille et leur forme sont uniformes. *Nosema bombycis* est dimorphique, puisqu'il produit deux types de spores dans son cycle de vie : une spore mûre ovale et longue de type enroulé et un autre type de spores enroulées pyriformes. Les spores viables sont en général réfractives au microscope et on les distingue facilement grâce à cette propriété.

Sur le plan ultrastructural, la spore a une paroi extérieure épaisse qui est constituée des couches suivantes, une exospore protéinique extérieure, une endospore chitineuse au milieu et une membrane intérieure plasmatique (Vavra, 1976 ; Sprague, 1982 ; Larsson, 1986). L'exospore est soluble dans de l'alcali. Sa surface est en général ondulée et peut être ornée de stries. L'endospore est composée d'un ensemble protéine-chitine. Cette couche apporte à la paroi de la spore la résistance suffisante pour supporter la pression interne générée par l'exclusion du filament polaire.

Le sporoplasme a un ou deux noyaux. Il n'est pas séparé par une membrane de liaison de l'appareil d'expulsion du filament polaire. La membrane de limitation du sporoplasme se développe pendant le passage du sporoplasme lorsque le filament est expulsé (Vavra, 1976). L'appareil d'expulsion de la spore est unique et c'est une structure complexe. Il occupe la plupart de la spore et est constitué par un filament polaire, avec son mécanisme d'ancrage et le polaroplaste. Vers l'extrémité arrière de la spore, se trouve une vacuole. Dans la partie antérieure de la spore, la " calote polaire " du disque d'ancrage, auquel est attachée l'extrémité de base du filament polaire, est enfermée dans le sac polaire ou polaroplaste (Huger, 1960 ; Larsson, 1986). Le disque fonctionne comme une charnière quand le filament est expulsé. On considère que l'ensemble filament polaire - polaroplaste vient du même système membranaire.

Le tube polaire sert " d'aiguille d'inoculation " et sa présence dans la spore permet de classer un organisme dans le Phylum des Microspora (Issi, 1986). Il est typiquement comme un fil et est ancré dans la partie antérieure (système du polaroplaste) de la paroi cellulaire par un disque d'ancrage à couches multiples (Vavra, 1976 ; Larsson, 1986). Le filament est expulsé à l'arrière et forme des boucles qui s'enroulent autour de la surface interne de la paroi de la spore. La position de base du filament près du lieu d'attache est plus épaisse que ses autres parties. Le nombre de boucles du filament à l'intérieur des spores peut varier à l'intérieur d'une espèce, ce qui est typiquement le cas de *Nosema bombycis* : il existe un type avec quelques boucles et un autre type avec des boucles nombreuses (Iwano et Ishihara, 1991). Le filament polaire expulsé fait environ $0,1 \mu\text{m}$ de diamètre et dans certains

cas jusqu'à 400 μm de long. Deux nouveaux microsporidiens (souche 1 et souche 2), isolés récemment sur le ver à soie au *Silkworm Seed Technology Laboratory* du *Central Silk Board*, à Bangalore présentent aussi une variation du nombre de boucles dans leurs spores.

Germination des spores :

La germination des spores coïncide avec l'expulsion du filament polaire. Elle est influencée par plusieurs facteurs comme les changements de pH, les types d'ions présents, la pression osmotique autour des spores, les conditions de température, les substances d'inhibition et les propriétés biochimiques des spores (Undeen, 1990). Undeen (1990) a proposé une hypothèse concernant le mécanisme de germination des spores microsporidiennes, qui s'appuie sur la conversion du tréhalose à l'intérieur de la spore en sucres réducteurs, qui entraîne l'augmentation de la pression osmotique, puis un mouvement rapide d'eau dans la spore et l'expulsion consécutive du filament polaire.

Plusieurs chercheurs ont étudié des méthodes de germination artificielle des spores microsporidiennes (Undeen, 1978 ; Oshima, 1964 ; Ishihara, 1967). Le pre-traitement avec un pH élevé (amorçage) et l'inoculation consécutive dans une culture de cellules d'insectes s'avère très efficace pour faire germer les spores (Kawarabata et Ishihara, 1984). Le pH élevé du liquide digestif dans l'intestin des larves de lépidoptères, apporte la stimulation naturelle pour la germination des spores de *Nosema bombycis*. On a réalisé des études de germination chez différents microsporidiens isolés sur le ver à soie et d'autres insectes lépidoptères au *Silkworm Seed Technology Laboratory*, du *Central Silk Board* à Bangalore.

On a étudié et on a comparé la réponse de germination avec la souche standard de *N. bombycis* en suivant la méthode de neutralisation (Oshima, 1937). Les spores fraîchement purifiées des nouvelles microsporidies et les spores de *N. bombycis* sont incubées pendant 30 min. dans différentes concentrations de solution KOH (0,05 % ; 0,1 % ; 0,2 % ; 0,3 % ; 0,4 % ; 0,5 % ; 0,6 % ; 0,7 % et 0,8 %). On neutralise les échantillons traités après l'incubation avec du PBS (solution tamponnée au phosphate, pH 6,8) et on observe la germination des spores sous un microscope à contraste de phase. Les spores qui ont germé apparaissent noires sous un microscope à contraste de phase et on observe de fins filaments polaires expulsés de la spore, avec un sporoplasme rond à leurs extrémités. On calcule le % de germination en utilisant la méthode d'Undeen et Avery (1984) (Tableau I). Les microsporidies qui présentent la réponse de germination la plus élevée tendent à présenter une pathogénicité plus importante pour les vers à soie.

Cycle de vie de *Nosema bombycis* :

Plusieurs chercheurs ont étudié le cycle de développement de *Nosema bombycis* chez les lignées cellulaires d'insectes et ont fourni des rapports complets sur son cycle de vie en employant des techniques de microscopie électronique et optique (Kawarabata et Ishihara, 1984 ; Iwano et Ishihara, 1991). Après l'entrée dans l'intestin moyen de la larve, les spores germent sous l'influence des conditions alcalines de l'intestin.

Le tube polaire est expulsé avec une telle force qu'il se place directement dans une cellule épithéliale. Le sporoplasme avec ses deux noyaux est injecté par le tube polaire dans la cellule. Le sporoplasme est un type diffus de cellule simple avec peu de différenciation cytoplasmique. En général, le sporoplasme se développe en un schizonte qui subit une schizogonie répétée. Plus tard, les schizontes filles entrent en sporogonie et produisent des sporontes. Les sporontes ont des spores caractéristiques réfractives. Le genre *Nosema* est dispore et suit un développement aplanosporoblastique où les sporoblastes ne sont pas enfermés dans une vésicule sporophore. *Nosema bombycis* est dimorphique et produit deux types différents de spores, un type qui est en forme de poire et qui a moins de boucles dans le filament polaire et un autre type qui est typiquement ovale et a un nombre plus important de boucles dans la zone polaire. Le premier type est responsable de la transmission du parasite de cellule à cellule et propage l'infestation dans un individu et l'autre type qui est expulsé d'un hôte infesté, est responsable de la contamination et de la propagation de

l'infestation d'un hôte à l'autre. Les spores pyriformes (spores avec de petites boucles) germent spontanément dans une cellule et libèrent un sporoplasme dans les cellules adjacentes auxquelles on se réfère comme des formes infectieuses secondaires (SIF) (Kawarabata et Ishihara, 1984). Ces auteurs ont désigné les sporoblastes comme des sporoplastes de phase-I et comme des sporoblastes de phase-II, en fonction de leur stade de développement. Les sporoblastes de phase-I se caractérisent par la présence d'un corps sphérique à la coloration foncée. Alors que les sporoblastes de la phase I se développent en sporoblastes de phase II, le corps sphérique se réarrange et le contenu de ces sporoblastes se colore à peine avec du Giemsa. Finalement, des noyaux compacts, que l'on peut colorer en rouge foncé avec du Giemsa, se forment dans les spores immatures. La morphogénèse consécutive de la spore entraîne la formation de noyaux très denses et d'une paroi cellulaire plus réfractive.

Caractéristiques et symptômes de la maladie :

La maladie est caractérisée par certains symptômes très typiques. Ces symptômes varient en fonction du stade de développement du ver à soie. Les œufs pondus par les papillons infestés par la pébrine sont peu nombreux et leur éclosion est très mauvaise et irrégulière. En général les œufs très infestés sont agglutinés les uns aux autres et ils ne collent pas fermement aux cartons de pontes. Ils contiennent un pourcentage élevé d'œufs morts et non fécondés. Les larves infestées ont peu d'appétit, une croissance et un développement retardés et une mue irrégulière, ce qui entraîne des disparités concernant leur taille. Alors que la maladie progresse, les larves deviennent pâles et ternes et, en général, rétrécissent après la mue. En raison de la nature chronique de la maladie, les larves ne meurent pas immédiatement et continuent à vivre pendant une certaine période. On remarque aussi des points semblables à des grains de poivre sur la peau des larves très infestées. L'intestin infesté devient opaque et des pustules blanches apparaissent sur les glandes séricigènes. En général, les larves pébrinisées meurent à cause de la désorganisation mécanique de leurs tissus et du manque de nutriments (pour leur corps). Les nymphes infestées ont l'abdomen gonflé et noirâtre et occasionnellement des taches noires apparaissent sur cette zone (Ishihara, 1963). Les nymphes très infestées n'arrivent pas à se métamorphoser en adultes. Le papillon a des ailes et une antenne déformées et son corps est décoloré. Les papillons infestés ne présentent pas les comportements typiques d'accouplement et leur fécondité est très mauvaise. On remarque occasionnellement des taches noires sur les ailes et sur la zone abdominale et les papillons sont ternes. Chez les papillons pébrinisés, les glandes auxiliaires sont infestées, ce qui entraîne la ponte d'œufs non regroupés qui se détachent facilement des cartons de pontes.

Incidence et fréquence sur le terrain :

La survie des spores de *Nosema bombycis* dans l'environnement et l'incidence saisonnière de la pébrine sont influencées par plusieurs facteurs. Dans des pays tropicaux comme l'Inde, on remarque que l'incidence de la pébrine est élevée pendant les saisons des pluies et les saisons plus fraîches, probablement en raison des élevages intensifs de vers à soie au cours de ces saisons. Cela pourrait aussi être dû au taux plus élevé de survie des spores sur le terrain pendant ces saisons, en raison des conditions d'humidité. La survie des spores dépend du type de substance dans lesquelles elles se trouvent et de la teneur en eau de la substance (Maddox, 1973). Plusieurs chercheurs ont étudié la relation entre l'épizootie et les conditions climatiques (Dasgupta, 1950 ; Jameson, 1922 ; Noamani et coll., 1971 ; Samson et coll., 1990) et les résultats obtenus sont très variables. Jameson (1922) a enregistré une incidence plus élevée de pébrine en août-septembre, proportionnelle à l'augmentation de l'humidité dans l'atmosphère pendant cette saison. Au contraire, Noamani et coll., (1971) ont observé une intensité plus élevée de pébrine en juillet-août, puis en novembre-décembre. Ces auteurs considèrent qu'il y a une corrélation entre l'incidence de la maladie et la température ou l'humidité. Les principales caractéristiques impliquées dans le début et le développement de la maladie, sont le nombre de pathogènes, la population hôte et des moyens efficaces de transmission.

Cependant, ces facteurs sont affectés par les facteurs abiotiques (Tanada, 1963). L'épizootie devient plus complexe quand le pathogène a un grand choix d'hôtes ou que l'hôte est sensible à l'infestation par un autre groupe de microsporidiens. Malheureusement, il y a très peu d'études sur le long terme sur l'épizootologie des protozoaires en général et sur la pébrine en particulier. Il serait très intéressant d'avoir plus d'études réalisées sur plusieurs années y compris sur les niveaux d'infestation, les sources de contamination, le mode de propagation, les densités de populations hôtes, les facteurs climatiques, etc.. La plupart des données disponibles sur les niveaux d'infestation et sur les densités de populations hôtes, ont été recueillies pendant une période où la fréquence était élevée.

La production de graines de vers à soie en Inde est organisée selon un système de multiplication à trois étages, où la graine parent est multipliée en série à partir de stations P4 à P1 et par la suite on multiplie l'hybride F1 pour l'exploitation commerciale. Depuis 1991-1992, le *Silkworm Seed Technology Laboratory* à Bangalore réalise une étude de contrôle de la pébrine dans les zones de grainage du sud de l'Inde, c'est à dire dans les états du Karnataka, de l'Andhra Pradesh et du Tamil Nadu, couvrant différentes saisons, c'est à dire l'été, la saison des pluies et l'hiver (Tableau II). L'incidence de la pébrine est descendue à un niveau minimum sur le terrain. Cependant, on n'a pas observé de tendance définitive par rapport à la saison dans aucun des états (Kamble et coll., 2005). Les pertes de récoltes dues à la pébrine dépendent de l'âge de la larve au moment de la contamination pendant l'élevage. L'infestation primaire (qui se produit par l'infestation des œufs de manière transovarienne) entraîne en général la perte totale de la récolte dès le troisième âge. Lorsque l'infestation a lieu aux premier et au deuxième âges, cela entraîne une perte de récoltes, qui a un effet sur la production de cocons. L'infestation pendant les derniers âges larvaires entraîne la production de papillons infestés, ce qui a un effet sur la production de graines.

Sources de contamination :

La graine infestée de manière transovarienne est la première source de contamination sur le terrain. La pièce d'élevage, les instruments d'élevage contaminés et la litière du ver à soie contribuent aussi à la propagation de la maladie à un degré non moins important. Dans une étude précédente, Ishihara (1985) a rapporté que le changement du profil épizootique correspond au changement du nombre de larves qui sécrètent des spores de *Nosema bombycis*. On a isolé des microsporidiens, sérologiquement apparentés à *Nosema bombycis* et à d'autres espèces chez d'autres lépidoptères, recueillis dans des zones de culture du mûrier, ce qui suggère une voie possible de contamination pour les élevages de vers à soie (Kawarabata et coll., 1990).

Stade de contamination :

La contamination par la pébrine se produit à n'importe quel moment pendant les stades larvaires. Avec la transmission transovarienne, le pathogène se transmet à la génération suivante par les œufs. Les faibles infestations par le pathogène tendent à passer inaperçues pendant une génération et augmentent progressivement au cours des générations (Singh et coll., 2006). La maladie peut passer inaperçue en raison de l'infestation partielle des œufs et la mort des larves infestées au cours des premiers âges peut aussi échapper à la détection.

Les larves qui éclosent, à partir de pontes infestées de manière transovarienne, présentent une croissance irrégulière et meurent dans la litière avant la 3^{ème} mue. Quand on élève des larves saines avec des larves infestées, il se produit une contamination secondaire per os. La contamination qui se produit à partir de larves infestées de manière transovarienne, s'appelle la première étape de la contamination. Les larves infestées per os pendant le 1^{er} et le 2^{ème} âge présentent ainsi des symptômes à la fin du 4^{ème} ou du 5^{ème} âge et meurent avant le filage. Si la contamination a lieu au troisième âge, les larves présentent des symptômes à la fin du 5^{ème} âge et meurent sur l'encabanage avant la formation du cocon. Ces larves déchargent des spores par les matières fécales au cours des 4^{ème} et 5^{ème} âges. Quand les larves saines, dans la litière infestée, consomment des spores avec les feuilles de mûrier, elles deviennent à leur tour infestées. Ce stade de contamination est connu comme la

deuxième étape de la contamination. Les larves infestées de cette manière filent des cocons normaux et éclosent mais elles pondent des œufs infestés de manière transovarienne.

Contamination secondaire et propagation de la maladie :

La contamination secondaire a lieu normalement par les pièces, les ustensiles d'élevage et les muraies contaminés et par les pontes dont la surface est contaminée. Dans la litière, la contamination a lieu par la matière fécale rejetée par les larves infestées, par la claie et le papier des sièges contaminés et par la poussière de la pièce contaminée et les larves meurent à cause de la maladie. Les spores libérées par ces sources s'installent sur la feuille de mûrier avec la poussière en formant la source de contamination secondaire dans la litière.

Si l'on se débarrasse des détritux du ver à soie et des larves de vers à soie d'une manière incorrecte et négligente et si l'on utilise des déchets de litière de ver à soie pas complètement décomposés dans les muraies, cela pourrait représenter des sources potentielles de contamination. Les œufs dont la surface est contaminée entraînent une transmission au travers de l'œuf. De même, si on incube les pontes dans une pièce contaminée, sans désinfection correcte, cela peut entraîner la contamination de la surface des œufs et au cours du processus d'éclosion, les larves saines deviennent infestées. Pendant le processus d'éclosion, les larves mordent le chorion, ce qui entraîne l'infestation. Les écailles du papillon et l'urine sont aussi d'autres sources possibles de contamination de la surface. Singh et coll., (2002) ont rapporté que le papillon mâle de *B. mori* infesté a un effet négatif sur l'efficacité de l'accouplement, la fécondité et l'éclosion. L'utilisation de papillons mâles infestés pour la production de graines entraîne aussi un niveau élevé de contamination. Quand on accouple des mâles infestés avec un papillon femelle non infesté, il se produit une transmission vénérienne des spores, qui en fin de compte entraîne un mauvais diagnostic pendant l'examen du papillon femelle. Patil et coll., 2002, ont aussi constaté les mêmes résultats en ce qui concerne le rôle des mâles infestés dans la transmission vénérienne de la maladie de la pébrine chez *B. mori*.

Hôte alternatif :

Plusieurs insectes parasites sont des hôtes alternatifs pour les microsporidiens, qui induisent une épizootie chez l'hôte primaire. On a rapporté une infestation naturelle par des microsporidiens chez plusieurs autres lépidoptères, en l'occurrence *Pieris rapae*, *Spodoptera depravata*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura* et *Diaphania pulverulentalis*. On sait que 32 espèces d'insectes lépidoptères développent l'infestation après l'inoculation per os des spores de *N. bombycis* (Veber, 1958). Il s'agit de *Balataea funeralis*, *Cryptophlebia illepidia*, *Exartema mori*, *E. morivirum*, *Diaphania pyralis*, *Chilo suppressalis*, *Pieris brassicae*, *P. rapae*, *Mycalesis gotoma*, *Abraxas miranda*, *Desorba simplex*, *Boarmia selenia*, *Menophra atrilineata*, *Thaumatopoea processionea*, *Malacosoma neustria*, *Gastropacha quercifolia*, *Lasiocampa quercus*, *Bombyx mandarina*, *Antheraea pernyi*, *A. yamamai*, *Sphinx ligustri*, *Agrius cinagulatus*, *Phalera assimilis*, *Acronicta major*, *Arctomyia aceris*, *Achaea janata*, *Agrotis ipsilon*, *Elydina nonagrica*, *Otosema odera*, *Perigea ilecta*, *Plusia chalcites*, *Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera mauritia*, *S. exigua*, *S. litura*, *Stilpnotia salicis*, *Lymantria dispar*, *Saturina pyri*, *Hyphantria cunea*, *Arctia caja*, *A. villica*, *Spilosoma lubricipeda*, *S. imparilis* et *Callimorpha quadripunctata* (Kawarabatta, 2003).

Infectiosité croisée :

On a observé que différents insectes qui vivent dans et autour de la muraie, véhiculent des microsporidiens qui sont infectieux de manière croisée pour les vers à soie. Kishore et coll., (1994) ont rapporté, que certaines espèces de *Catopsilia*, qui sont des habitants fréquents des champs autour des muraies, transportent des quantités énormes de spores d'un microsporidien. On a constaté que ce microsporidien est infectieux pour les vers à soie. Samson et coll., (1999a et b) ont aussi rapporté que certains papillons véhiculent des microsporidiens qui sont infectieux pour le ver à soie. Au cours d'études récentes du *Silkworm Seed Technology Laboratory* à Bangalore, on a observé deux papillons,

en l'occurrence *Eurena hecabrae* et *Zizina otis*, qui contiennent des spores de microsporidiens qui sont infectieuses de manière croisée pour les vers à soie. De plus, *Spilosoma obliqua*, un parasite du mûrier, contient aussi des spores de microsporidiens, qui s'avèrent être infectieuses pour les vers à soie. Ces insectes sont donc une source potentielle de contamination pour l'élevage du ver à soie puisqu'ils font tomber les spores du pathogène sur les feuilles de mûrier dans la muraille par les écailles et par leurs déchets.

Etudes immunologiques :

Auparavant, l'identification des microsporidiens se basait principalement sur les caractéristiques morphologiques, en particulier sur la forme et sur la taille de la spore, sur la longueur du filament polaire et sur le nombre de boucles observées au microscope optique et électronique mais le dimorphisme que présentent les microsporidiens entraînent des difficultés pour les identifier exactement (Hazard et Weiser, 1968).

On a réussi à identifier différentes espèces de microsporidiens en utilisant une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Fowler et Reeves, 1974a, 1974b) et une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium (Streett et Briggs, 1982). Plus tard, on a utilisé des techniques immunologiques pour la détection des pathogènes et l'identification des espèces, on a diagnostiqué *Nosema bombycis* et des espèces étroitement apparentées en utilisant du latex sensibilisé à l'anticorps (Hayashiya et Ayuzawa, 1987), les procédures ELISA (Kawarabata et Hayasaka 1987 ; Watanabe, 1987) et une technique d'anticorps fluorescents (Sato et coll., 1981). On a également eu recours à des anticorps monoclonaux pour l'identification de microsporidiens spécifiques. On a aussi eu recours à des techniques d'immuno-diffusion doubles pour étudier la relation taxonomique entre les différents microsporidiens (Knell et Zam, 1978). Langley et coll., (1987) ont rapporté une méthode améliorée de caractérisation des protéines de la spore de microsporidiens, en utilisant une électrophorèse bi-dimensionnelle sur gel de polyacrylamide (2D-PAGE). Cette méthode augmente le nombre de polypeptides, séparés des extraits protéiques de la spore de *Nosema locustae*, à 2 – 3 reprises sur une PAGE bi-dimensionnelle. De même, avec la 2D-PAGE chacune des empreintes des protéines de la spore des espèces examinées, en l'occurrence *Nosema locustae*, *Nosema bombycis* et *Vairimorpha nectar* est unique et on détermine facilement les différences de composition des protéines de leurs spores. Baig et coll., 1992 ont constaté que le test antiserum au latex lié à la protéine A (PALLAS) est plus sensible que le test ordinaire d'agglutination au latex. On observe que le test PALLAS développe une agglutination positive, claire, visible avec un nombre minimum de spores de 1×10^6 spores par ml. On a constaté que le test d'agglutination au latex basé sur les anticorps monoclonaux (MCAs) pour la détection de l'infestation de la pébrine chez le ver à soie est aussi efficace que l'examen microscopique (Shamim et coll., 1997).

Vossbrinck et coll., (1987) ont suggéré que le Phylum qui mène aux microsporidiens se sépare très tôt de celui qui conduit à d'autres eukaryotes, d'après la séquence de l'ARN ribosomique. Norman et coll., (1996) ont suggéré que *N. tricola* est un synonyme de *N. bombycis* d'après la séquence des SSU de l'ARNr. Les anticorps monoclonaux à *N. locustae* reconnaissent la spore et le filament polaire expulsé (Knoblett et Youssef, 1996). Malone et McIvor (1995) ont identifié des fragments d'ADN qui s'hybrident spécifiquement avec l'ADN de *N. bombycis* et l'ADN de *N. costelytrae*, les deux fragments sont riches en AT (respectivement 59 et 79 % des bases totales), ont des ratios G+C/A + T de respectivement 0,70 et 0,25 et représentent des séquences répétées dispersées dans tout le génome. Elaine et coll., (2001) ont identifié des MAb qui peuvent reconnaître un / des antigène(s) de microsporidiens courants et pourraient être utiles pour mettre au point des réactifs dans les tests de détection des microsporidies chez les insectes.

On a pu réorganiser la signification de ces différences ultrastructurales après des études récentes sur les relations phylogénétiques (Baker et coll., 1995 ; Hartskeerl et coll., 1995 . Leipe et coll., 1993 ; Hung et coll., 1998). On utilise maintenant la reconstruction phylogénétique d'après l'ADN polymorphique amplifié au hasard (RAPD) et la comparaison des séquences SSU – ARNr pour

classifier et détecter différents micro-organismes (Cavalier – Smith et Chao 1996 ; Dugoured et coll., 1996) y compris les microsporidies (Kawakami et coll., 1992 ; Vossbrinck et coll., 1993 ; Baker et coll., 1994 ; 1995 ; Hung et coll., 1998 ; Raynaud et coll., 1998 ; Hatakeyama et coll., 2000). Tsai et coll., (2003) ont rapporté une relation phylogénétique entre les différents isolats de microsporidies infestant différents lépidoptères en utilisant les RAPDs.

Les difficultés concernant l'identification correcte des espèces *Nosema*, même quand on procède à des études détaillées sur l'infestation et à un examen complet au microscope optique et électronique sont bien illustrées par Mercer et Wigley (1987), qui n'ont pas pu distinguer une espèce de *Nosema*, qu'ils avaient trouvée chez le perforateur de la feuille *Sceliodes cordalis*, de 12 autres espèces *Nosema* connues pour infester les lépidoptères. La classification assez rapide des microsporidies d'après les caractéristiques de leur cycle de vie, leur taille, leur forme, et l'ultrastructure de la spore, a entraîné la création non nécessaire de nouvelles espèces *Nosema*. La technologie ADN est de plus en plus utilisée pour le diagnostic et la caractérisation rapides de micro-organismes non cultivables, poussant laborieusement et lentement (Tompkins, 1992 ; Olive et Bean, 1999 ; Garcia, 2002).

Les répétitions de séquence simple (SSRs), appelées aussi micro-satellites, sont des répétitions en tandem de di, tri, tetra et penta-nucléotides, qui sont abondantes et se trouvent dans des sites multiples (Beckmann et Weber, 1992 ; Wang et coll., 1994 ; Field et Wills, 1996) dans tous les génomes eucaryotiques. La caractéristique importante de cette classe d'ADN répétés est son hypervariabilité, qui s'exprime principalement comme une variation du nombre de copies des répétitions en tandem sur un site particulier ; il a été prouvé que c'est le marqueur génétique le plus puissant. En raison de cette courte longueur de la répétition et de l'interaction limitée de ces sites individuels, on peut facilement les étudier avec les applications PCR (Saghai Maroof et coll., 1994 ; Moore et coll., 1991 ; Schlotterer et coll., 1991). Des rapports ont été publiés sur plusieurs méthodes PCR, basées sur l'amplification des fragments du gène de l'ARNr, servant à diagnostiquer et à identifier les espèces de microsporidies d'insectes (Kawakami et coll., 1995 ; 2001). Les techniques moléculaires pour détecter les spores sont très sensibles et très spécifiques. On peut utiliser la PCR en utilisant plusieurs amorces, pour l'inspection de la pébrine chez les œufs de vers à soie (Hatakeyama et Hayasaka, 2003). Les scientifiques de la Division de Pathologie de la Graine du *Silkworm Seed Technology Laboratory*, du Central Silk Board à Bangalore ont isolé deux nouveaux microsporidiens de vers à soie, nommés à titre d'essai Souche-1 et Souche-2. D'après les résultats obtenus par l'analyse RAPD-PCR, ces microsporidiens sont des variantes de *Nosema bombycis*.

Nageswara Rao et coll., (2004) ont étudié la pathogénicité, le mode de transmission, la spécificité des tissus infestés et les séquences du gène de la petite sous-unité d'ARNr (SSU-ARNr) chez trois nouveaux isolats de microsporidiens du ver à soie, *Bombyx mori*. Sur les trois, NIK-2r révèle des caractéristiques de cycle de vie et une séquence de gène de l'ARNr-SSU similaire à *Nosema bombycis*, ce qui suggère que c'est *N. bombycis*. Les deux autres, NIK-4m et NIK-3h, diffèrent l'un de l'autre ainsi que de *N. bombycis*. NIK-4m est très pathogène et ne présente pas de transmission verticale, comme le montre l'absence apparente d'infestation gonadique tandis que NIK-3h est moins pathogène et on ne détecte pas de transmission verticale mais on ne peut pas l'exclure. L'analyse phylogénétique d'après la séquence des gènes SSU de l'ARNr place NIK-3h et NIK-4m dans un clade différent qui inclut presque toutes les espèces *Vairimorpha* et les espèces *Nosema*, qui infestent des hôtes lépidoptères et non-lépidoptères, tandis que NIK-2r est inclus dans un clade contenant presque tous les isolats de *Nosema*, qui n'infestent que les hôtes lépidoptères. Nageswara Rao et coll., (2005) ont rapporté la caractérisation génétique et la relation entre les différentes microsporidies qui infestent le ver à soie, *Bombyx mori*, en utilisant une analyse PCR (ISSR-PCR). On distingue six différents microsporidiens par la classification de l'ADN en utilisant l'ISSR-PCR. L'analyse ISSR-PCR peut être un outil puissant pour détecter les polymorphismes et détecter les microsporidiens qui sont difficiles à étudier au microscope en raison de leur très petite taille. Sur les 6 isolats de microsporidiens, NIK-1s révèle une séquence de gène de l'ARNr-SSU similaire à celle de *Nosema bombycis*, ce qui indique que NIK-1s est similaire à *N. bombycis* ; les 5 autres isolats, qui diffèrent

l'un de l'autre et de *N. bombycis* sont considérés comme des variants différents qui appartiennent à l'espèce *N. bombycis*.

FUTURES PERSPECTIVES

Dans le domaine des microsporidiens, bien que beaucoup de travaux aient été effectués, ils ont surtout porté sur la recherche des aspects épizootiologiques de la maladie. Parce que la connaissance approfondie de l'épizootie de la microsporidiose chez le ver à soie, *Bombyx mori*, est une condition nécessaire pour la gestion de la maladie. Auparavant, les identifications des microsporidiens étaient principalement basées sur la microscopie optique, la microscopie électronique et sur la biochimie. Par la suite, on a mis au point des techniques sérologiques, qui représentent un outil important pour diagnostiquer la maladie. Récemment, les scientifiques ont conseillé l'approche par ISSR-PCR ainsi que la RAPD, la RFLP et l'analyse de la séquence SSU-ARNr, qui apportent beaucoup pour caractériser et différencier les isolats de microsporidiens de *B. mori* étroitement apparentés. De plus, des études appropriées sont nécessaires pour diagnostiquer la maladie en utilisant les progrès de la biotechnologie, ce qui représentera une aide importante pour l'industrie séricicole.

UTILIZATION OF SEX LIMITED BREEDS IN SILKWORM SEED PRODUCTION IN INDIA – A REVIEW

C. R. HEGDE & C. K. KAMBLE

Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi village, Bangalore-560 035, India.

The present system followed to separate the male and female silkworms at pupal stage during hybrid seed production is laborious and also not 100% fool proof. Whereas utilization of sex-limited breeds would give 100% sex separation without giving chance of mixing parental eggs. Thus farmer gets "true hybrid" seed and seed producer earns extra income by diverting the unused cocoons for reeling. In India, at present Rs 30 million can be saved annually in seed production by utilizing sex limited breeds. Though more than 22 sex-limited breeds have been developed in India, none of them have become popular due to low viability and susceptibility to diseases. Therefore, there is a need to develop promising sex-limited breed keeping in view the advantage it has got in seed production.

Keywords: Sex-limited, true hybrid, sex separation, larval marking, yellow cocoon.

INTRODUCTION

Even though India stands second in the world, in silk production, 90% of the mulberry silk produced is multivoltine based (Dandin, 2005). Indian sericulture is developing new Bivoltine silkworm breeds for high grade silk to compete in the international market. However, before the development of the productive Bivoltine breeds, Indian sericulture is going to continue with Multi × Biv. hybrids for silk production. In this context, various organizations have already chalked out the plan for production of bivoltine silk which is superior in quality and fetches a higher price in the international market. To develop the bivoltine sericulture industry, the basic input i.e., industrial silkworm seed, should be of higher quality. High quality bivoltine hybrid seeds can be produced only by adopting improved techniques. One such method is to produce "true hybrids" by avoiding inbreeding of moths during eclosion. To avoid inbreeding, male and females should be separated invariably before moth emergence. At present, male and females are separated in pupal stage based on the sexual marking. The female pupa has longitudinal slit or an "X" mark in between the 8th and 9th segment on the ventral side. Male pupa is characterized by a 'dot' on 10th segment. Though this method is in vogue now, there are few aspects, which make it less efficient. They are (1) the method is highly laborious (2) considerable number of pupae are damaged while cutting the cocoons (3) there is damage to the naked pupae by *Dermestid* beetle during preservation.

Under these circumstances sex limited breeds are very useful in the production of true hybrids, both Multi × Biv and Biv × Biv. where male and females are separated based on either the larval markings or cocoon colour. Thus it ensures 100% sex separation and also the cocoons, which are not utilized for seed production, can be diverted for reeling, which helps the graineur to generate extra revenue. Farmer gets true hybrid seed without mixing of any parental eggs. Subsequently farmer can harvest uniform quality cocoons and will get higher price. Thus both farmer and the seed producer are benefited.

Table I. List of sex limited breeds developed in India.**Tableau I. Liste des lignées limitées au sexe mises au point en Inde.**

Race	Sex differentiations by larval marking or cocoon colour	Parentage	Developed
	<i>Différenciations liées au sexe par le marquage larvaire ou par la couleur du cocon</i>	<i>Lignée</i>	<i>Mise au point</i>
I. Multivoltine / Polyvoltines			
ZPN (SL)	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	Zebra-SL, Nistari	CSRTI, Berhampore
Nistari (SL)	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	Nistari, API(SL)	CSRTI, Berhampore
DI4b (SL)	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	DI4b, API(SL)	CSRTI, Berhampore
MBD-IV (SL)	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	MBD-IV	CSRTI, Berhampore
API (SL)	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	---	CSRTI, Mysore
MYI (SL)	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	API(SL), MYI	CSRTI, Mysore
PM (SL)	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	API(SL), PM	CSRTI, Mysore
SL-KMS	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	KBS, PM	DOS, Karnataka
SL-KPMS	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	SL-X, PM	KSSRDI, Bangalore
II. Bivoltines / Bivoltines			
SL-J112	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	Sanish 18, J-112	CSRTI, Berhampore
SI-C110	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	Sanish 18, C-110	CSRTI, Berhampore
HS6-SL	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	HS6	CSRTI, Pampore
CC1-(SL)	Yellow cocoon / <i>Cocon jaune</i>	CC1, Japanese SL race	CSRTI, Mysore
Zebra-SL	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	CC1, Japanese SL race	CSRTI, Berhampore
KBS	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	---	DOS, Karnataka
SL-Wu8	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	Tokia, Fyuo	KSSRDI, Bangalore
CSR3	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	Kinshu, Showa	CSRTI, Mysore
CSR8	Yellow cocoon / <i>Cocon jaune</i>	SL,-Wu8, CH32	CSRTI, Mysore
CSR12	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	BN18, BCS25, CC1	CSRTI, Mysore
CSR18	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	NB4D2, Japanese	CSRTI, Mysore
CSR19	Larval marking / <i>Marquage larvaire</i>	SL race	CSRTI, Mysore
CSR2 (SL)	Yellow cocoon / <i>Cocon jaune</i>	BN18, BCS25, KA	CSRTI, Mysore
		B201, BCS12	CSRTI, Mysore
		CSR, Japanese SL race	

Source: Rajendra Mundkur *et al.* (2002)

WHAT IS A SEX LIMITED BREED?

Generally, in silkworm, male and females are differentiated in adult (moth) stage. But, there are some breeds in which male and females are differentiated either in egg or larva or cocoon stage (not pupal stage) based on the specific morphological characters. These breeds are called sex-limited breeds. In sex limited black egg breeds, the female eggs are black and male eggs are white. Only male eggs will hatch resulting in unisex larvae. In sex limited larval marking breeds the male is plain without any larval markings. The female has an 'eye spot' marking on the second thoracic segment, a pair of crescent markings on the dorsal side of the second abdominal segment and a pair of 'star' marks on the dorsal side of the 5th abdominal segment in addition to the sooty grey random mosaic colour all over the body. In sex-limited breeds with cocoon colour the female cocoons are yellow and male cocoons are plain.

Table II. Comparative performance of sex limited breeds and normal breeds.

Tableau II. Performance comparative de lignées limitées au sexe et de lignées normales.

Breed	Fecundity	Survival	Yield/ 10000 larvae (kg)	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio
<i>Lignée</i>	<i>Fécondité</i>	<i>Survie</i> (%)	<i>Rendement /</i> <i>10 000</i> <i>larves (kg)</i>	<i>Poids</i> <i>du cocon</i> (g)	<i>Poids de</i> <i>la coque</i> (cg)	<i>Richesse</i> <i>soyeuse</i> (%)
Sex Limited / Limitées au sexe						
CSR13	525	88.0	15.81	1.83	44.5	24.3
CSR12	550	86.0	15.62	1.87	45.8	24.5
CSR18	500	92.3	15.25	1.70	37.2	21.9
CSR19	475	92.0	14.80	1.62	35.0	21.6
CSR8	430	89.5	15.30	1.72	35.8	20.8
Normal / Normales						
KA	560	83.3	15.78	1.90	37.0	19.6
NB ₄ D ₂	545	90.3	16.48	1.83	36.2	20.2
CSR2	550	91.4	16.70	1.84	44.9	24.4
CSR5	525	83.4	15.30	1.74	41.4	23.8

HISTORY OF SEX LIMITED BREEDS

Though theoretical principles for developing the sex marked silkworm was proposed verbally by Soviet geneticist, A.S. Serebrovsky during late 1930s (Strunnikov, 1983), first sex-limited silkworm strain was synthesized by Tazima during 1941 using x-ray irradiation where female larvae were marked and male larvae were plain. Three years later again Tazima (1944) developed two more sex limited races which were named Shi No.116 and Nichi No.117 by translocating a gene responsible for sable marking (p-s) from second chromosome to W- chromosome. On the initiative of Astaurov, Gulamov and Strunnikov started investigations at the Central Asia Research Institute of Sericulture to obtain a breed by using the radiation method that would be sex-marked by the character of egg

colour (Strunnikov and Gulamov, 1957,1958,1959,1969). As a result, two sex marked stocks were obtained in which the female eggs, like in Japanese stocks, had dark colouration, whereas no pigment was formed in the male eggs and they were light yellow. Later, Mano *et al.*, (1969) and Mano (1984) developed a series of sex limited breeds like J-124, J-131, J-134, J-140, Asa-H with larval markings which exhibited improved characteristics. Silkworm breeds with sex limited characteristics were also evolved at egg stage. Tazima (1951) came out with a sex limited strain with black egg where only white coloured male eggs hatch. Thus rearing of only male larvae would lead to minimizing the consumption of mulberry leaf and maximizing cocoon productivity. But such sex limited breeds could not be used commercially due to low viability and poor hatchability.

Table III. Comparative performance of hybrids produced from sex limited breeds.

Tableau III. Performance comparative d'hybrides produits à partir de lignées limitées au sexe.

Hybrids	Survival	Yield/ 10000 larvae	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio	Silk filament length
<i>Hybrides</i>	<i>Survie</i>	<i>Rendement / 10 000 larves (kg)</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>Longueur du filament de soie (m)</i>
	(%)		(g)	(cg)	(%)	
CSR3 × CSR6	94.1	19.37	2.05	50.2	24.5	1295
CSR12 × CSR6	96.0	19.22	2.01	48.9	24.3	1216
CSR12 × CSR19	97.0	18.20	1.88	41.2	21.9	1146
CSR2 × CSR5	96.5	19.41	2.02	49.1	24.3	1218
(Control) / (Témoin)						

Source: Mal Reddy *et al* (2003)

It was during 1970's the scientists began to consider that sex separation based on cocoon colour would be more effective than by larval markings. In this direction, Kimura *et al.* (1971) succeeded in breeding a new silkworm race with yellow female cocoons and white male cocoons. They translocated the yellow blood gene (y) from the 2nd chromosome to W-chromosome through gamma radiation to the female pupae of yellow cocoon race. The contribution of Kimura *et al.*, (1971) showed the way for development of few more sex-limited breeds with coloured cocoon. One such instance is, (NBY3 × NBY7), a sex limited breed with yellow cocoon colour developed by Yamamoto (1989).

In India, Sengupta (1968) transferred the larval markings to J112 and C112 bivoltine strains from Sanish 18, a Russian 'sex limited' race. Nagaraju *et al.*, (1987 and 1989) developed a sex limited Pure Mysore race using AP1 (SLA) a multivoltine stock as a donor parent. Since then many efforts have been made to evolve sex limited breeds (Rajendra and Sadananda, 1990, Iyengar *et al.*, 1983, Datta *et al.*, 2000 & 2001 abc, Basavaraj *et al.*, 2004).

Table IV. Comparison of female and male cocoon characters of sex limited breeds with normal breeds.

Tableau IV. Comparaison des caractères du cocon chez la femelle et le mâle entre les lignées limitées au sexe et les lignées normales.

Breed	Female / Male	Cocoon weight	Shell weight
Lignée	Femelle / Mâle	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)
Sex limited breeds / Lignées limitées au sexe			
CSR ₃	Female / Femelle	2.03	45.5
	Male / Mâle	1.63	44.5
CSR ₈	Female / Femelle	1.82	35.0
	Male / Mâle	1.62	36.6
Normal breeds / Lignées normales			
NB ₄ D ₂	Female / Femelle	2.02	37.9
	Male / Mâle	1.63	35.5
CSR ₂	Female / Femelle	2.07	46.4
	Male / Mâle	1.60	43.4

Table V. Performance of CSR8 in combination with Pure Mysore (mean of 5 trials).

Tableau V. Performance de CSR8 en combinaison avec Pure Mysore (moyenne de 5 essais).

Hybrid	Larval duration		Pupation rate (%)	Cocoon yield 10000 larvae (kg)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Filament length (m)
	Total D:h	Total D:h						
<i>Hybride</i>	<i>Durée larvaire</i>		<i>Taux de nymphose (%)</i>	<i>Rendement en cocons / 10 000 larves (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (cg)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>
	<i>Total J : h</i>	<i>Total J : h</i>						
PM × CSR ₈	23:15	7:00	95.9	19.23	1.99	35.6	17.9	900
PM × NB ₄ D ₂	23:12	6:21	95.7	19.52	2.04	35.3	17.3	875
% improvement								
% d'amélioration	0.5	1.8	0.2	-1.5	-2.5	0.9	3.5	2.9

Source: Mal Reddy *et al* (2003)

REVENUE GENERATED BY UTILIZING SEX LIMITED BREEDS DURING PRODUCTION OF MULTIVOLTINE × BIVOLTINE HYBRIDS

India requires about 330 million of cross breed layings annually. If 75% of the total requirement is PM combination which works out to be 247.50 million. The requirement of bivoltine, CSR2 (normal) cocoon is around 495 million and 50% of the cocoons (female) are not utilized. The female cocoon works out to 247.50 million (number) or 353.57 MT @ 700 cocoons per Kg by weight. After emergence, the sale of the pierced cocoons would fetch Rs.24.8 million (Rs.250 per 2500 cocoons × 247.50 million). If the sex limited CSR2 (SL) is used the female cocoons (yellow) can be sent for reeling and it costs about Rs.42.40 million @ 120/Kg × 353.7 and value of CSR2 (SL) male pierced cocoons would be Rs.12.4 million (Rs.250/2500 cocoons × 12.8 million). The total returns if sex limited CSR2 (SL) is utilized it would be Rs.54.8 million (Rs.42.4 million + Rs.12.4 million)

The net gain would be Rs.30 million per year (Rs.54.80 million – 24.80 million) Basavaraj *et al* (2004).

CONCLUSION

Even though many sex limited breeds have been developed in India, none of them have become popular in the field, therefore, sex limited breeds are not being utilized in M × B production at present. Further, there is a need to develop high yielding and disease tolerant breeds which suit the Indian conditions. Finally a pricing policy for sex limited breeds also needs to be worked out to support the seed rearer.

REFERENCES

- BASAVARAJ, H.K. DANDIN S.B., MAL REDDY N, JOGE P.G., KARIAPPA B.K. & YAMAGUCHI A. (2004) Sex Limited bivoltine breed "Nandi" – a boon for cross breed egg production. *Indian Silk*, 43(4):23-26.
- BHARGAVA S.K. THIAGARAJAN V., RAMESH BABU M & NAGARAJ B (1993) Evaluation of bivoltine races of silkworm with sex limited expression of larval markings and cocoon colour. *Indian J.Seric* 32:234-237.
- DANDIN S.B., BASAVARAJ H.K. & SURESH KUMAR (2005) Silkworm breeds and hybrids at galore. Published by Central Sericultural Research and Training Institute (CSR&TI) Mysore. p 51.
- DATTA R.K., BASAVARAJA H.K., MAL REDDY N., NIRMAL KUMAR S., AHSAN M.M., SURESH KUMAR & RAMESH BABU M (2000) Evolution of new bivoltine hybrid CSR3 x CSR6. *Sericologia*, 40(3):407-416.
- DATTA R.K., BASAVARAJA H.K., MAL REDDY N., NIRMAL KUMAR S., SURESH KUMAR N & RAMESH BABUM., AHSAN M.M., & JAYASWAL K.P. (2001a) Breeding of new productive bivoltine hybrid CSR12 X CSR6 of Bombay mori L. *Int. J Entomol* 3(2); 127– 133.
- DATTA R.K., SURESH KUMAR N., BASAVARAJA H.K., KISHORE KUMAR C.M. & MAL REDDY N. (2001b) "CSR18 x CSR19" A robust bivoltine hybrid for all season rearing, *Indian Silk* 39(12): 5-7.
- DATTA R.K., BASAVARAJA H.K., MAL REDDY N.KALPANA G.V., JOGE P.G. PALIT A.K. & JAYASWAL K.P. (2001c) "CSR8" Sex limited bivoltine breed. A boon for graineurs. *Indian Silk* 39 (11): 5-7.
- IYENGAR M.N.S. GANESH N.K. & TIKOO B.L. (1983) Breeding of two improved sex limited multivoltine strains. In: National seminar on silk research and development, March, 10-13, Bangalore.
- KIMURA K., HARADA C & AKAI H (1971) Studies on "W" chromosome translocation in yellow blood gene in silkworm. *Jap. J. Breed.* 21: 199-203.

- MAL REDDY N. KALPANA G.V., & JOGE P.G. (2003) Breeding of economically viable sex-limited silkworm breeds In: Concept papers in mulberry silkworm breeders' summit. APSSRDI, 18-19 July, 2003, Hindupur (AP).
- MANO Y., KAZAKO NAGASAWA & IWAO YAMAMOTO (1969) On the breeding of auto sexing silkworm varieties, N131 X C131. Bull. Seric. Expt. Stn 23(5): 441 – 468.
- MANO Y. (1984) Studies on the breeding of autosexing silkworm races in Japan. Sericologia 24(3): 389 – 392.
- NAGARAJU J. JOLLY M.S. & NOAMONI M.K.R. (1987) Sex limited multivoltine strain for commercial exploitation Indian Silk 25(10) 23-25.
- NAGARAJU J., PREMALATHA V., RAVIDNRA SINGHY., NOAMANI M.K.R. & JOLLY M.S. (1989) Isolation of a polyvoltine strain with sex limited larval markings in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) Sericologia 29(4): 495 – 502.
- RAJENDRA MUNDKUR & SADANANDA S.S. (1990) SL-KMS, A new sex limited strain, Indian Silk 28 (11): 7-10.
- RAJENDRA MUNDKUR, MALLESH MURTHY, NAGABHUSHANA, GUPTA K.N., KRISHNA RAO S, & RAGHURAMAN R. (2002) Sex limited races of silkworm *Bombyx mori* as useful grainage tool. Indian Silk, 40(3): 3-15.
- SEN GUPTA K. (1968) Sex limited characters in two races of *Bombyx mori* L. Ind. J. of Seric. 1:79-86.
- STRUNNIKOV V.A. (1983) Control of silkworm reproduction, Development and sex, Mir Publishers, Moscow. p 280.
- STRUNNIKOV V.A. & GULAMOV L.M. (1958) An experiment on the construction of the silkworm sex marked lines by x-ray irradiation. In: Reports of Scientific Technical Conference on use of radioactivity and ionizing radiation.
- STRUNNIKOV V.A. & GULAMOV L.M. (1959) Results of two years of operations to produce a silkworm breed, sex-marked at the egg stage. In: Reports of Scientific Technical Conference on use of radioactivity and ionizing radiation (Russian).
- STRUNNIKOV V.A. & GULAMOV L.M. (1969) Artificial sex control in the silkworm, Communication-I: Development of sex marked breeds of *Bombyx mori*, Genetik (USSR)5:6
- STRUNNIKOV V.A. & GULAMOV L.M. (1957) Production of silkworm breeds by the method of radiational selection, Vastnik s/kh nauk(USSR) p 8.
- TAZIMA Y. (1941) A simple method of sex discrimination by means of larval markings in *Bombyx mori* L. J. Seric Sci Jpn. 12:184-188.
- TAZIMA Y. (1944) Studies on chromosome aberration in the silkworm. II, Translocations involving second and w-chromosomes, Bull. Seric. Exp. Stn., Jpn. 12:109-181.
- TAZIMA Y, HARADA C & OHTA N, (1951) On the sex discriminating method by colouring genes of silkworm eggs. Jpn J. Breed. 1(1): 47-50.
- YAMAMOTO T. (1989) Breeding of sex limited yellow cocoon races of silk worms by chromosome manipulation. Farming Japan 23(5): 42-48.

UTILISATION DE LIGNÉES LIMITÉES AU SEXE DANS LA PRODUCTION DE GRAINES EN INDE

C. R. HEGDE & C. K. KAMBLE

Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi Village, Bangalore – 560 035, Inde.

Le système actuel utilisé pour séparer les vers à soie mâles et femelles au stade nymphal pendant la production de graines d'hybrides est laborieux et pas infaillible à 100 %. Tandis que l'utilisation de lignées limitées au sexe donnerait 100 % de séparation des sexes sans courir le risque de mélanger les œufs parentaux. Les fermiers auraient donc des graines de " vrais hybrides " et le producteur de graines gagnerait un revenu supplémentaire en envoyant les cocons inutilisés au dévidage. Actuellement, en Inde, on pourrait économiser 30 millions de Rs. par année dans la production de grainage en utilisant des lignées limitées au sexe. Bien que l'on ait mis au point plus de 22 lignées limitées au sexe en Inde, aucune d'elles n'est devenue populaire à cause de leur viabilité peu élevée et de leur sensibilité aux maladies. Il est donc nécessaire de mettre au point une lignée limitée au sexe prometteuse, qui présente aussi des avantages pour la production de graines.

INTRODUCTION

Bien que l'Inde soit le deuxième pays producteur de soie dans le monde, 90 % de la soie mûrier est polyvoltine (Dandin, 2005). La sériciculture indienne met au point de nouvelles lignées de ver à soie bivoltines pour obtenir une soie de qualité élevée afin de rivaliser sur le marché international. Cependant, avant la mise au point de lignées productives bivoltines, la sériciculture indienne va continuer à produire de la soie avec des hybrides Multi × Biv. Dans ce contexte, plusieurs organisations ont déjà esquissé un plan pour la production de soie bivoltine, qui est supérieure en qualité et atteint un prix plus élevé sur le marché international. Pour développer l'industrie de la sériciculture bivoltine, il faut que l'apport de base, c'est à dire la graine de ver à soie industrielle, soit de qualité élevée. On ne peut mettre au point des graines hybrides bivoltines de qualité élevée qu'en adoptant des techniques améliorées. Une de ces méthodes consiste à produire de " vrais hybrides " en évitant la consanguinité des papillons pendant l'émergence. Pour éviter la consanguinité, il faudrait immanquablement séparer les mâles et les femelles avant l'émergence du papillon. A l'heure actuelle, on sépare les mâles et les femelles au stade nymphal d'après le dimorphisme sexuel. La nymphe femelle a une fente longitudinale ou la marque " X " entre le 8^{ème} et le 9^{ème} segment sur le côté ventral. La nymphe mâle est caractérisée par un " point " sur le 10^{ème} segment. Bien que cette méthode soit en vogue à l'heure actuelle, quelques aspects la rendent moins efficace. D'abord, (1) la méthode est très laborieuse, (2) un nombre considérable de nymphes est abimé lorsqu'on ouvre les cocons et (3) les nymphes nues sont abimées par le coléoptère *Dermestide* pendant la conservation.

Dans ces circonstances, les lignées limitées au sexe sont très utiles pour la production de vrais hybrides, à la fois Multi × Biv et Biv × Biv, où l'on sépare les mâles et les femelles d'après les marquages larvaires ou la couleur du cocon. Cela assure donc 100 % de séparation des sexes et, de plus, les cocons qui ne sont pas utilisés pour la production de graines, peuvent être utilisés pour le dévidage, ce qui aide le graineur à générer un revenu supplémentaire. Le fermier obtient une véritable graine d'hybride sans mélanger les œufs parentaux. Par la suite, le fermier peut recueillir des cocons

de qualité uniforme et obtiendra des prix plus élevés. Cela profite donc à la fois au fermier et au producteur de graine.

QU'EST CE QU'UNE LIGNEE LIMITEE AU SEXE ?

En général, chez le ver à soie, on différencie les mâles et les femelles au stade adulte (papillon). Mais, il existe quelques lignées chez qui les mâles et les femelles sont différenciés soit au stade de l'œuf ou de la larve ou du cocon (pas au stade nymphal) d'après les caractères morphologiques spécifiques. On appelle ces lignées "lignées limitées au sexe". Chez les lignées limitées au sexe à œufs noirs, les œufs femelles sont noirs et les œufs mâles sont blancs. Seuls les œufs mâles éclosent, ce qui donne des larves unisexes. Chez les lignées à marquage larvaire limité au sexe, le mâle est uni sans aucun marquage larvaire. La femelle a une marque "de masque" sur le deuxième segment abdominal et une paire de marques en étoile sur le côté dorsal du 2^{ème} segment thoracique, en plus de la mosaïque de couleur gris suie qui couvre tout son corps. Chez les lignées limitées au sexe avec un cocon de couleur, les cocons femelles sont jaunes et les cocons mâles sont blancs.

HISTOIRE DES LIGNEES LIMITEES AU SEXE

Bien que les principes théoriques pour mettre au point un ver à soie marqué au sexe, aient été présentés verbalement par un généticien soviétique A. Serebrovsky à la fin des années 1930 (Strunnikov, 1983), la première souche de ver à soie limitée au sexe a été mise au point par Tazima en 1941 en utilisant l'irradiation aux rayons x où les larves femelles sont marquées et les larves mâles sont unies. Trois ans plus tard, Tazima (1944) a à nouveau mis au point deux lignées limitées au sexe supplémentaires qui ont été nommées Shi No. 116 et Nichi No. 117 en transloquant un gène responsable du marquage sable (p-s) du second chromosome au chromosome -W. A l'initiative d'Astaurov, Gulamov et Strunnikov ont commencé des études au *Central Asia Research Institute of Sericulture* pour obtenir, en utilisant la méthode d'irradiation, une lignée qui serait marquée au sexe d'après le caractère de la couleur de l'œuf (Strunnikov et Gulamov, 1957, 1958, 1959, 1969). En conséquence, on a obtenu deux souches marquées au sexe où les œufs femelles, comme chez les souches Japonaises, ont une coloration foncée, tandis qu'aucun pigment ne se forme chez les œufs mâles qui sont jaunes clair. Plus tard, Mano et coll., (1969) et Mano (1984) ont mis au point une série de lignées limitées au sexe telles que J-124, J-131, J-134, J-140, Asa-H avec des marquages larvaires présentant des caractéristiques améliorés. On a aussi mis au point des lignées de vers à soie avec des caractéristiques limitées au sexe au stade de l'œuf. Tazima (1951) a mis au point une souche limitée au sexe avec des œufs noirs, où seuls les œufs mâles de couleur blanche éclosent. L'élevage de larves mâles seules devrait permettre de minimiser la consommation de feuilles de mûrier et de maximiser la productivité des cocons. Mais de telles lignées limitées au sexe n'ont pas pu être utilisées commercialement à cause de leur viabilité peu élevée et de leur mauvaise capacité d'éclosion.

C'est pendant les années 1970, que les scientifiques ont commencé à considérer que la séparation des sexes d'après la couleur du cocon serait plus efficace que par les marquages larvaires. Dans cette optique, Kimura et coll., (1971) ont réussi à élever une nouvelle race de ver à soie avec des cocons femelles jaunes et des cocons mâles blancs. Ils ont transloqué le gène du sang jaune (y) du 2^{ème} chromosome au chromosome -W par irradiation gamma des nymphes femelles de la race de cocons jaunes. La contribution de Kimura et coll., (1971) a montré la direction à suivre pour mettre au point d'autres lignées limitées au sexe selon la couleur du cocon. Un de ces exemples est (NBY3 × NBY7), une lignée limitée au sexe au cocon de couleur jaune, mise au point par Yamamoto (1989).

En Inde, Sengupta (1968) a transféré les marquages larvaires de Sanish 18, une race russe "limitée au sexe" aux souches bivoltines J112 et C112. Nagaraju et coll., (1987 et 1989) ont mis au point une race, Pure Mysore, limitée au sexe en utilisant API (SLA), une souche polyvoltine, comme parent donneur. Depuis, de nombreux efforts ont été faits pour mettre au point des lignées limitées au sexe

(Rajendra et Sadananda, 1990, Iyengar et coll., 1983, Datta et coll., 2000 et 2001 abc, Basavaraj et coll., 2004).

REVENU GENERE EN UTILISANT DES LIGNEES LIMITEES AU SEXE PENDANT LA PRODUCTION D'HYBRIDES POLYVOLTINS × BIVOLTINS

L'Inde a besoin d'environ 330 millions de pontes hybrides par an. Si 75 % du besoin total est une combinaison PM, cela fait 247,5 millions. Le besoin en cocons bivoltins CSR2 (normaux) est d'environ 495 millions et 50 % des cocons (femelles) ne sont pas utilisés. Les cocons femelles représentent 247,5 millions (en nombre) ou 353,57 t à raison de 700 cocons par kg. Après l'émergence, la vente des cocons percés rapporte 24,8 millions de Rs (250 Rs pour 2500 cocons × 247,50 millions). Si l'on utilise CSR2 limité au sexe (SL), on peut faire dévider les cocons femelles (jaunes) et cela rapporte environ 42,40 millions de Rs. à raison de 120 / kg × 353,7 et la valeur des cocons mâles percés de CSR2 (SL) serait de 12,4 millions de Rs (250 Rs. / 2500 cocons × 12,8 millions). Les profits totaux si l'on utilise CSR2 (SL), limité au sexe, seraient de 54,8 millions de Rs. (42,4 millions de Rs + 12,4 millions de Rs.).

Le gain net serait de 30 millions de Rs. par an (54,80 millions de Rs – 24,80 millions) Basavaraj et coll., (2004).

CONCLUSION

Bien que beaucoup de lignées limitées au sexe aient été mises au point en Inde, aucune d'elles n'est devenue populaire sur le terrain, les lignées limitées au sexe ne sont donc pas utilisées à l'heure actuelle dans la production de P × B. Par ailleurs, il est nécessaire de mettre au point des lignées à rendement élevé et tolérant les maladies, qui sont adaptées aux conditions indiennes. Enfin, il faut également mettre au point une politique des prix pour soutenir l'éleveur de graines.

EXPRESSION OF MESSENGER RNA ENCODING A Y-BOX PROTEIN OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* AND ACCUMULATION IN OVARIAN FOLLICLE CELLS

KOJI YAMAMOTO, TARO OKADA, YUTAKA BANNO & HIROSHI FUJII

Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
6-10-1 Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan. Fax, +81-92-624-1011; E-mail:
yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

We have cloned and sequenced a cDNA encoding a novel Y-box protein of the silkworm, *Bombyx mori* (YBP: *Y-box protein*) in a previous study (Yamamoto *et al.*, 2005). To better understand the physiological properties, we examined the localization of mRNA encoding YBP. We found that YBP mRNA was expressed in pupal ovaries during oogenesis. *In situ* hybridization revealed that YBP mRNA was highly expressed in the follicle cells of the ovary, suggesting that the YBP could play important roles in transcriptional and translational regulation in the follicle cell.

Keywords: *Bombyx mori*, *in situ* hybridization, Northern blot, silkworm, Y-box protein.

INTRODUCTION

Y-box protein (YBP) is known to be a DNA- or RNA-binding protein that regulates transcriptional and translation repression (Izumi, *et al.*, 2001; Wolffe, 1994). It is reported that YBP interacts with promoters containing the particular nucleotide sequence named the Y-box element, which controls gene expression (Fukuda & Tonks, 2003). Many YBPs have been found in various vertebrate and invertebrate species (Matsumoto & Wolffe, 1998). All YBP members contain a cold shock domain (CSD) that is responsible for the interaction with nucleic acid and is evolutionarily highly conserved. Cold shock proteins were first identified in *Escherichia coli* (Phadare *et al.*, 1999) and translation of its target RNA was controlled (Jiang *et al.*, 1997). The *Homo sapiens* Y-box protein (Didier *et al.*, 1988), *Xenopus laevis* YBP (Tafari & Wolffe, 1990) and many other CSD proteins in vertebrates bind specifically to a promoter element and modulate the transcriptional process.

YBPs in mice exist in a messenger ribonucleoprotein particle (mRNP) complex in its spermatocytes (Davies *et al.*, 2000). The mRNP is believed to prevent the recruitment of mRNA to ribosomes for translation until the correct developmental time (Sommerville & Ladomery, 1996). In many organisms, early development after fertilization appears to be under maternal control and does not require transcription of the embryonic genome (Davidson, 1976). Insect maternal mRNAs are transcribed in the nurse cells during oogenesis, accumulated in the oocyte and involved in protein synthesis during early embryogenesis. For the silkworm, *Bombyx mori*, maternal mRNAs were detected in unfertilized eggs and shown to be translatable in an *in vitro* system (Fujii & Kawaguchi, 1982). Since the mRNPs, including maternal mRNA, were identified in unfertilized eggs (Fujii & Kawaguchi, 1982), the protein is thought to be a potential candidate for the regulation of protein synthesis in the silkworm. We have already cloned and sequenced a novel YBP of the silkworm (Yamamoto *et al.*, 2005). For better understanding of the physiological aspects of these mechanisms,

we investigated the localization and developmental change of YBP mRNA during oogenesis by Northern hybridization and *in situ* hybridization.

MATERIALS AND METHODS

Insects and tissues:

Silkworm larvae (p50 strain) were maintained and reared on fresh mulberry leaves at the Institute of Genetic Resources, Kyushu University (Fukuoka, Japan). Various tissues from day 3, 5th instar larvae and pupal ovary at day 5 after pupation, were dissected in ice-cold 0.75% NaCl, immediately frozen with liquid N₂, and stored at - 80° C until use.

Cloning of cDNA encoding silkworm YBP:

We have cloned and sequenced a cDNA encoding YBP (Yamamoto *et al.*, 2005). The sequence information was deposited into GenBank (accession no. AB290613). The DNA fragment was ligated into pGEM-T Easy vector (Promega, USA).

Northern blot hybridization:

Total RNAs were extracted from various tissues including the midgut, fat body, silk gland, ovary and testis by acid phenol-guanidinium thiocyanate-chloroform method (Sambrook *et al.*, 1989). Sepasol-RNAI (Nacalai tesque) was used as a denaturing solution for the extraction method. Samples (20µg per lane) were separated on 1.2% agarose gel containing 37% formaldehyde and transferred to a Hybond-N⁺ nylon membrane (Amersham Bioscience). The membrane was baked at 80° C for 2 h and the prehybridization was done with ECL gold hybridization buffer (0.5M NaCl, 5% blocking reagent; Amersham Bioscience) at 42° C overnight. The cDNA encoding YBP was used to prepare a probe. Signals were visualized using the ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection system according to the manufacturer's instruction (Amersham Bioscience).

In situ hybridization:

Hybridization probes for *in situ* hybridization were generated by *in vitro* transcription with T7 or T3 RNA polymerase for sense or antisense RNA labeling with digoxigenin-UTP (Roche). The cDNA encoding YBP was used to make riboprobe. Pupal ovaries were dissected, extracted and rinsed with ice-cold phosphate buffered saline (PBS). The ovary obtained at day 5 after pupation was fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1h, washed with PBS, and dehydrated with ethanol for 7 h and xylene for 10 min. Embedding was done using paraplast at 57° C for 10 min and the resultant block was kept at 4° C overnight. The paraplast block was sectioned and mounted on slides. The sections were rehydrated in xylene for 5 min (2 times), and then incubated with different concentrations of ethanol solution (5 min each in 100%, 90%, 80%, 70% and 50%) and finally with PBS for 5 min (2 times). The resultant was permeabilized with PBS containing 5 µg/ml proteinase K at room temperature for 5 min. They were then fixed with 4% paraformaldehyde for 3 min and rinsed briefly with PBS. The sections were hybridized at 50° C for 16 h in solution containing DIG-labeled riboprobe described above, 50% formamide, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 200 µg/ml tRNA, 10% dextran sulfate, 10 µg/ml sonicated salmon sperm DNA, 600 mM NaCl, 0.25% SDS, and 1 mM EDTA (pH 8.0). After hybridization, the sections were rinsed with 5 × SSC at 50° C for 20 min and 50% formamide in 2 × SSC at 50° C for 20 min, and 0.2 × SSC at 50° C for 20 min. After rinsing with 0.1M Tris-HCl (pH 8), the resultant was incubated using 1× blocking reagent (KPL) for 10 min, and then with 1000-fold peroxidase conjugated to antibody against DIG in the same buffer at 4° C overnight. Signals were detected by TrueBlue peroxidase substrate (KPL) for 10 min.

RESULTS AND DISCUSSION

Tissue distribution of YBP mRNA:

We have already obtained cDNA encoding YBP homolog from the *B. mori* (d43 strain) (Yamamoto *et al.*, 2005). The deduced amino acid sequence of the YBP showed 85, 42, 41 and 40% identities to YBPs from *B. mori* (Kinshu × Showa strain), *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*, respectively. Both isoforms of the silkworm possess 85 % homology each, with the diversity of C-terminal regions (Yamamoto *et al.*, 2005; Takiya *et al.*, 2004). The C-terminal sequences of YBPs are thought to enhance the ability of DNA- or RNA-binding activity (Jiang, *et al.*, 1997). We found that the CSD responsible for the catalytic mechanism is highly conserved in the amino acid sequence of the YBP. The CSD has homologies to those from *B. mori* (Kinshu × Showa strain) (100%), *D. melanogaster* (82%), *H. sapiens* (81%) and *X. laevis* (80%).

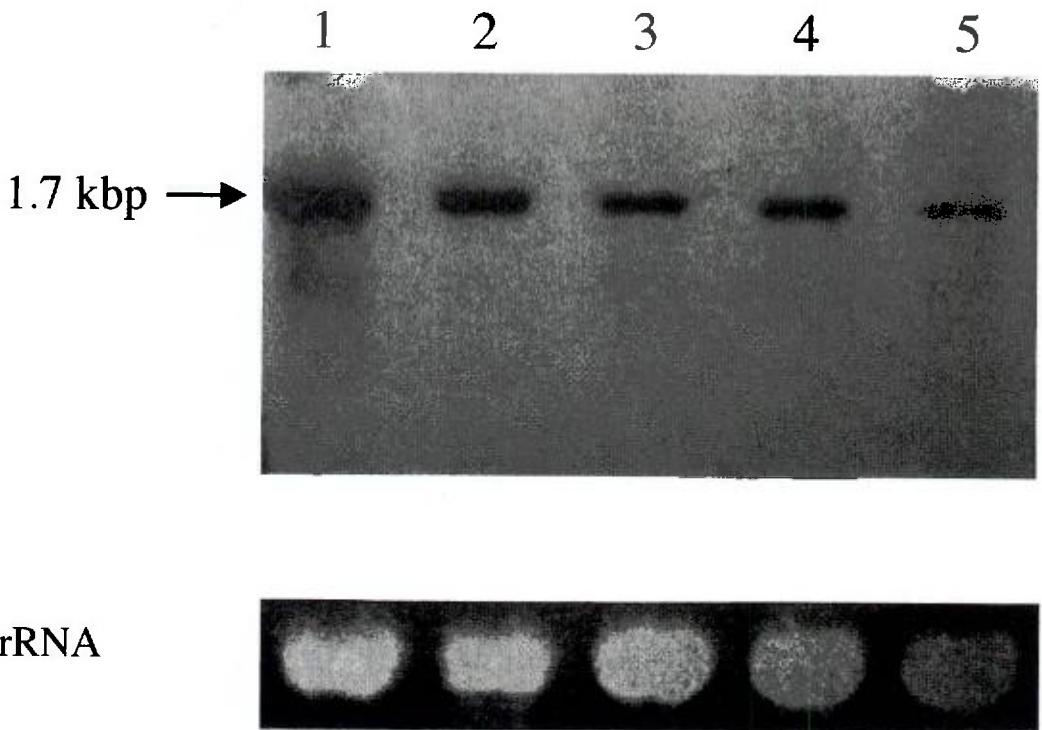


Figure 1. Tissue distribution of YBP mRNA.

Tissue distribution of YBP mRNA was analyzed by Northern hybridization. EtBr stain of rRNA is shown as a control. **Lane 1:** midgut, **Lane 2:** fat body, **Lane 3:** silk gland, **Lane 4:** ovary, **Lane 5:** testis.

Figure 1. Distribution de l'ARNm d'YBP dans les tissus.

On analyse la distribution dans les tissus de l'ARNm d'YBP par hybridation Northern. La tache d'ARNr colorée au Bromure d'Ethidium sert de témoin. **Trajet 1 :** intestin, **Trajet 2 :** corps gras, **Trajet 3 :** glande séricigène, **Trajet 4 :** ovaire, **Trajet 5 :** testicule.

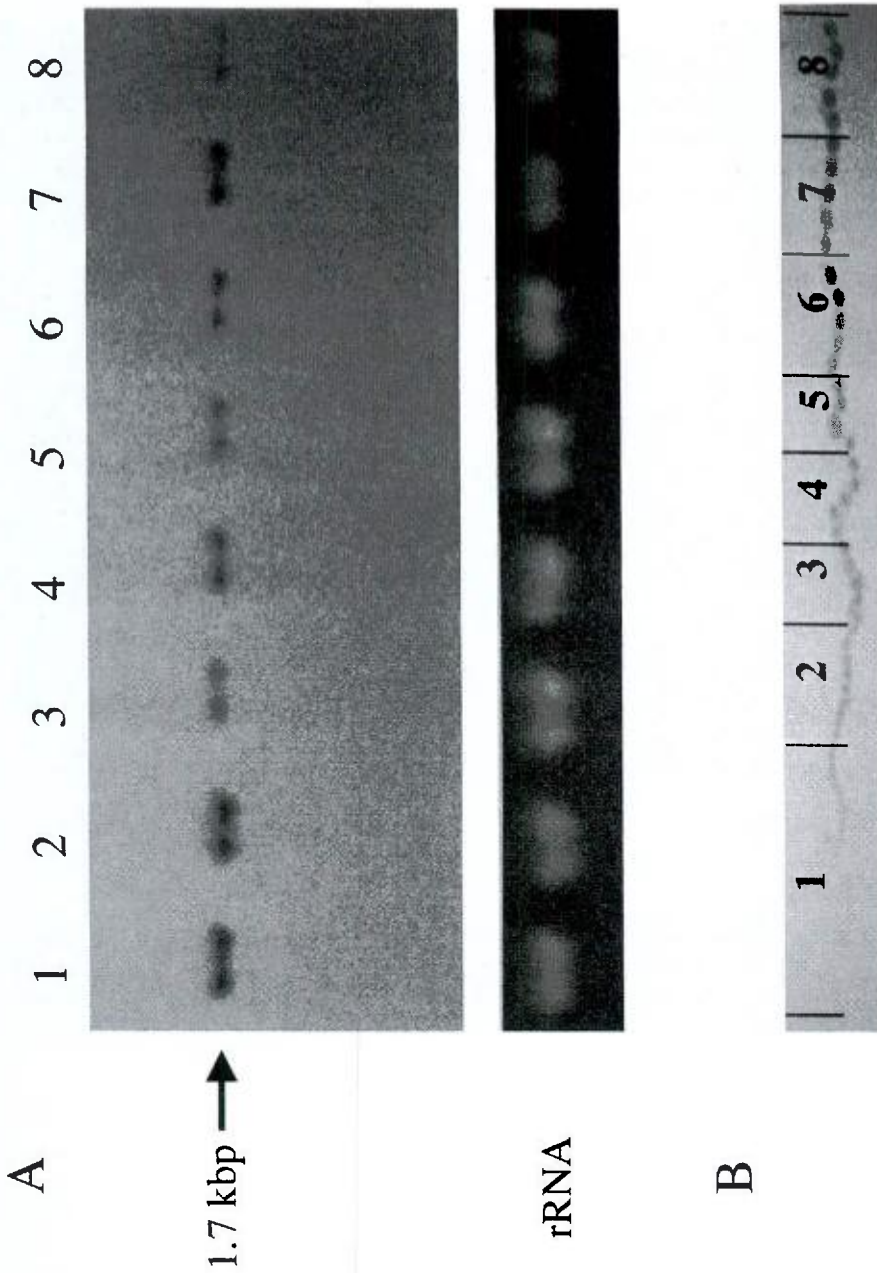


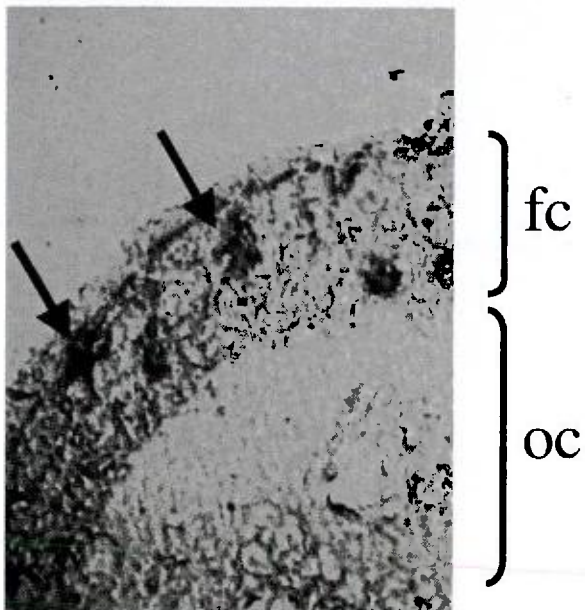
Figure 2. Expression of YBP mRNA during oogenesis.

(A) Expression pattern of YBP mRNA during oogenesis was analyzed by Northern hybridization. EtBr stain of rRNA is shown as a control. The number above picture corresponds to section of pupal ovary represented in Fig 1B. (B) Pupal ovary was distributed and numbered as sections 1 to 8.

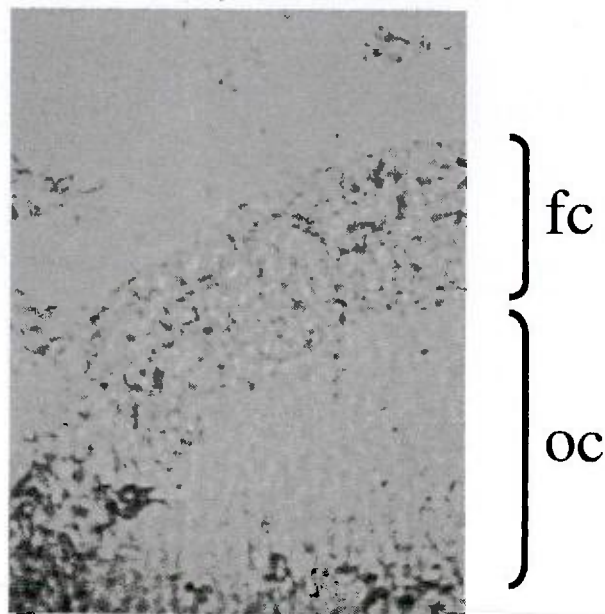
Figure 2. Expression de l'ARNm d'YBP pendant l'ovogénèse.

(A) On analyse le schéma d'expression de l'ARNm d'YBP pendant l'ovogénèse par hybridation Northern. La coloration d'une tache d'ARNr sert de témoin. Le numéro au-dessus de l'image correspond à la partie de l'ovaire nymphal représentée dans la Fig. 1B. (B) On divise et on numérote l'ovaire nymphal de la section 1 à la section 8.

A



B



K. YAMAMOTO

Figure 3. Localization of YBP mRNA by *in situ* hybridization.

Fc and oc represent follicle cell and oocyte, respectively. Signals were detected with antisense probe (A) but not with the sense probe (B). Arrows indicate the hybridization signals.

Figure 3. Localisation de l'ARNm d'YBP par hybridation *in situ*.

Fc et oc représentent respectivement la cellule folliculaire et l'ovocyte. On détecte des signaux avec une sonde antisens (A) mais pas avec une sonde sens (B). Les flèches indiquent les signaux d'hybridation.

For a better understanding of the physiological role of YBP, here, we examined the existence of the YBP mRNA in various tissues of the d43 strain. Total RNAs were extracted from the midgut, fat body, silk gland, ovary and testis of *B. mori* larvae on day 3 of the fifth instar and subjected to Northern hybridization. The Northern hybridization showed that a single band was detected in all tissue samples analyzed with a molecular size of 1.7 kb (Fig. 1). Similar results were obtained in medakafish, *Oryzias latipes* and the YBP of the medakafish was expressed in various tissues (Zend *et al.*, 2002). In the silkworm, the YBP mRNA was highly expressed in the midgut and fat body on day 3 of the fifth instar. Our results indicated that YBP is a ubiquitous protein containing the CSD.

Expression of YBP mRNA during oogenesis:

We investigated expression profile of the 1.7 kb transcript during oogenesis. As shown in Fig. 2B, the pupal ovary was dissected, extracted and divided into eight stages (from stage 1 to 8 as seen in Fig. 2B). Development of ovaries was observed during pharate adult development in the silkworm (Yamauchi & Yoshitake, 1984). Total RNA was extracted from each stage of the ovary and used in Northern hybridization. As shown in Fig. 2A, a single transcript of 1.7 kb was detected throughout oogenesis. The stronger signals were localized at stage 1, 2 and 7. At stage 1 and 2, formation and development of follicles during previtellogenesis occurred (Miya, 2003), whereas the maturation of pupal ovaries is observed at stage 7 and 8 (Yamauchi & Yoshitake, 1984). In stage 7 and 8, the follicle cells cover the oocyte and the nurse cell is degenerated (Yamauchi & Yoshitake, 1984). In the ovary of stage 8, the production of chorion or eggshell is initiated and it is difficult to prepare sections for *in situ* hybridization. The chorion or eggshell of *B. mori* is an elaborate structure consisting of more than 100 different polypeptides that are produced and secreted by the follicular cells during their terminal differentiation (Kafatos *et al.*, 1995). Thus, we decided to use the ovary of stage 7 for further analysis and focus on examination of the role of YBP at this stage.

In situ hybridization of YBP mRNA:

To investigate the localization of the YBP mRNA in the silkworm ovary, *in situ* hybridization with antisense / sense riboprobe was performed (Fig. 3). The YBP cDNA was used to prepare these probes. Compared to results from a DNA probe, we were able to detect higher signals and lower background with riboprobe (data not shown). In the hybridization with the antisense probe, the YBP mRNA was mainly restricted to follicle cells, whereas no signals were detectable by the current method in oocyte. No staining was observed in the control section treated with the sense probe. Our results suggest that YBP could modulate the expression of specific genes or mRNAs at this stage in the follicle cell. As described above, the production of chorion or eggshell is initiated at late oogenesis, and proteins consisting of chorion or eggshell would be synthesized at this time. It is reported that the promoter region of chorion gene contains a C/EBP DNA binding site and the C/EBP family protein is involved in the stage-specific expression of the chorion gene (Sourmeli *et al.*, 2003). Chorion mRNA is translated immediately without the accumulation phase of chorion mRNA during choriogenesis, suggesting that YBP may control the expression for some chorion genes, although there is no evidence that their promoter regions contain the Y-box element.

There is the possibility that YBP may play a part in transcriptional and translational regulation in other tissues of the silkworm in which YBP occurs. YBP of *B. mori* (Kinshu × Showa strain) enhanced the binding activity of fibroin-modulator-binding protein to its target DNA sequence in the silk gland (Takiya *et al.*, 2004). In other species, two isoforms of mouse Y-box protein are bound to the 3'-untranslated region of its protamine mRNA during spermatogenesis in mice testis (Davies *et al.*, 2000). The *Xenopus* YBP was associated with the transcriptional control of gene encoding a serine / threonine kinase in the oocytes (Olive *et al.*, 1994). In this context, it is necessary to search the target genes or mRNA for the silkworm YBP. We are in the process of carrying out gel shift assay and immunoprecipitation in order to examine their targets.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the National Bio-resources project (RR2002 for the silkworm) of the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan. We are grateful to Dr. Sakano for his consideration in reading this manuscript.

REFERENCES

- DAVIES H.G., GIORGINI F., FAJARDO M.A. & BRAUU R.E. (2000) A sequence-specific RNA binding complex expressed in murine germ cells contains MSY2 and MSY4. *Dev. Biol.*, 221, 7-100.
- DAVIDSON E. H. (1976) *Gene activity in early development* (2 ed edition), p. 452, Academic Press, New York.
- DIDIER D.K., SCHIFFENBAUER J., WOULFE S.L., ZACEIS M. & SCHWARTZ B.D. (1988) Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 7322-7326.
- FUKUDA T. & TONKS N.K. (2003) Identification of YB-1 as a regulator of PTP1B expression: implications for regulation of insulin and cytokine signaling. *EMBO J.*, 22, 479-493.
- FUJII H. & KAWAGUCHI Y. (1982) Maternal mRNA in an unfertilized egg of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 51, 503-509.
- IZUMI H., IMAMURA T., NAGATANI G., ISE T., MURAKAMI T., URAMOTO H., TORIGOE T., ISHIGUCHI H., YOSHIDA Y., NOMOTO M., OKAMOTO T., UCHIMI T., KUWANNO M., FUNA K. & KOHNO K. (2001) Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3' → 5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.*, 29, 1200-1207.
- JIANG W., HOU Y. & INOUE Y. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.*, 272, 196-202.
- KAFATOS F.C., TZERTZINIS G., SPOEREL N.A. & NGUYEN H.T. (1995) Chorion genes: an overview of their structure, function and transcriptional regulation. In: Goldsmith, M.R., Wilkins, A.S. (Eds.), *Molecular Model Systems in the Lepidoptera*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, p181-215.
- MATSUMOTO K. & WOLFFE A.P. (1998) Gene regulation by Y-box proteins coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.*, 8, 318-323.
- MIYA K. (2003) The early embryonic development of *Bombyx mori* (edited by YAGINUMA T. & SUZUKI K.). GENDAITOSHO.
- OLIVE M., THEZE N., PHILIPPE M., LE PENNEC J.P., LERIVRAY H. (1994) Cloning of the *Xenopus laevis* cdk2 promoter and functional analysis in oocytes and during early development. *Gene*, 30, 81-8.
- PHADTARE S., ALSINA J. & INOUE M. (1999) Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 175-180.
- SAMBROOK J., FRITSH E.F., & MANIATIS, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor University Press, New York.
- SOMMERVILLE J. & LADOMERY M. (1996) Masking of mRNA by Y-box proteins. *FASEB J.*, 10, 435-443.
- SOURMELI S., KRAVARITI L. & LECANIDOU, R. (2003) *In vitro* analysis of *Bombyx mori* early chorion gene regulation: stage specific expression involves interactions with C/EBP-like and GATA factors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33, 525-540.
- TAFURI S.R. & WOLFFE A.P. (1990) *Xenopus* Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 9028-9032.
- TAKIYA S., NISHITA Y., ISHIKAWA S., OHNO K., TAMURA T. & SUZUKI Y. (2004) *Bombyx* Y-box protein BYB facilitates specific DNA interaction of various DNA binding proteins independently of the cold shock domain. *J. Biochem.*, 135, 683-693.

- WOLFFE A.P. (1994) Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *BioEssays*, 16, 245-251.
- YAMAMOTO K., OKADA T., HE N., BANNO Y. & FUJII H. (2005) Identification and overexpression of Y-box protein isoform of the silkworm, *Bombyx mori*. *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, 10, 45-51.
- YAMAUCHI H. & YOSHITAKE N. (1984) Developmental stages of ovarian follicles of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Morphology*, 179, 21-31.
- ZEND-AJUSCH E., HORNUNG U., BURGTORF C., LUTJENS G., SHAN Z., SCHARTL M. & HAAF T. (2002) Isolation and characterization of cold-shock domain protein genes, *Oryzias latipes* Y-box protein 2 (OlaYP2) and *Fugu rubripes* Y-box protein 1 (FruYP1), in medakafish and pufferfish. *Gene*, 21, 111-119.

EXPRESSION DE L'ARN MESSAGER CODANT UNE PROTEINE DE LA BOÎTE-Y DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* ET ACCUMULATION DANS LES CELLULES FOLLICULAIRES DE L'OVAIRE

KOHI YAMAMOTO, TARO OKADA, YUTAKA BANNO & HIROSHI FUJII

Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japon. Fax : + 81 - 92 624 1011 ; E-mail : yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

*Dans une étude précédente, nous avons cloné et séquencé un ADNc codant une nouvelle protéine de la boîte-Y du ver à soie *Bombyx mori* [YBP : Y-box protein / protéine de la boîte-Y] (Yamamoto et coll., 2005). Pour mieux comprendre ses propriétés physiologiques, nous avons examiné la localisation de l'ARNm codant YBP. Nous avons trouvé que l'ARNm d'YBP s'exprime dans les ovaires de la nymphe pendant l'ovogenèse. L'hybridation *in situ* révèle que l'ARNm d'YBP s'exprime fortement dans les cellules folliculaires de l'ovaire, ce qui suggère qu'YBP pourrait avoir des rôles importants dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule folliculaire.*

INTRODUCTION

On sait que la protéine de la boîte Y (YBP) est une protéine de liaison à l'ADN ou à l'ARN qui régule la répression transcriptionnelle et traductionnelle (Izumi et coll., 2001 ; Wolffe, 1994). On sait qu'YBP interagit avec des promoteurs contenant la séquence nucléotidique particulière appelée élément de la boîte Y, qui contrôle l'expression du gène (Fukuda et Tonks, 2003). On a trouvé de nombreux YBP chez différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés (Matsumoto et Wolffe, 1998). Tous les membres YBP contiennent un domaine de choc au froid (CSD) qui est responsable de l'interaction avec l'acide nucléique et est fortement conservé au cours de l'évolution. Les protéines de choc au froid ont été en premier identifiées chez *Escherichia coli* (Phadare et coll., 1999) et on a contrôlé la traduction de son ARN cible (Jiang et coll., 1997). La protéine de la boîte-Y d'*Homo sapiens* (Didier et coll., 1988), l'YBP de *Xenopus laevis* (Tafari & Wolffe, 1990) et de nombreuses autres protéines CSD chez les vertébrés sont spécifiquement liées à un élément promoteur et modulent le processus transcriptionnel.

Les YBP chez la souris existent dans un complexe ARN messenger- protéines (mRNP) dans les spermatocytes (Davies et coll., 2000). On pense que la mRNP empêche le recrutement de l'ARNm par les ribosomes pour la traduction jusqu'au moment du développement correct (Sommerville & Ladomery, 1996). Chez de nombreux organismes, le début du développement après la fécondation semble être sous le contrôle maternel et n'a pas besoin de la transcription du génome embryonnaire (Davison, 1976). Les ARNm maternels de l'insecte sont transcrits dans les cellules nourricières pendant l'ovogénèse, accumulés dans l'ovocyte et impliqués dans la synthèse des protéines au début de l'embryogenèse. Pour le ver à soie, *Bombyx mori*, on détecte les ARNm maternels dans les œufs non fécondés et on sait qu'ils sont traduisibles dans un système *in vitro* (Fujii et Kawaguchi, 1982). Puisqu'on identifie les RNPM, y compris les ARNm maternels, dans les œufs non fécondés (Fujii & Kawaguchi, 1982), on pense que la protéine est un candidat potentiel à la régulation de la synthèse

des protéines chez le ver à soie. Nous avons déjà cloné et séquencé une nouvelle YBP du ver à soie (Yamamoto et coll., 2005). Pour mieux comprendre les aspects physiologiques de ces mécanismes, nous avons étudié la localisation et les variations de l'ARNm d'YBP pendant l'ovogenèse par hybridation Northern et par hybridation *in situ*.

MATERIELS ET METHODES

Insectes et tissus :

On maintient et on élève les larves de ver à soie (souche p50) sur des feuilles de mûrier fraîches à l'*Institute of Genetic Resources*, Kyushu University (Fukuoka, Japon). On dissèque des tissus variés à partir du 3^{ème} jour du 5^{ème} âge et l'ovaire nymphal le 5^{ème} jour après la nymphose dans du NaCl à 0,75 % refroidi dans de la glace, immédiatement gelés avec de l'azote liquide et stockés à -80° C jusqu'à leur utilisation.

Clonage de l'ADNc codant l'YBP du ver à soie :

Nous avons cloné et séquencé un ADNc codant YBP (Yamamoto et coll., 2005). On a déposé l'information de la séquence à GenBank (no. d'exemplaire AB290613). Le fragment d'ADN est ligaturé dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega, USA).

Hybridation Northern par buvardage :

On extrait tous les ARNs des différents tissus y compris de l'intestin moyen, du corps gras, de la glande séricigène, de l'ovaire et des testicules par la méthode à l'acide phénol-guanidinium thiocyanate-chloroforme (Sambrook et coll., 1989). On utilise l'ARNI-Sepasol (Nacalai tesque) comme solution de dénaturation pour la méthode d'extraction. On sépare les échantillons (20 µg par trajet) sur un gel d'agarose à 1,2 % contenant 37 % de formaldéhyde et on les transfère sur une membrane en Nylon Hybond-N⁺ (Amersham Bioscience). On cuit la membrane à 80° C pendant 2 h et on procède à la prehybridation avec un tampon d'hybridation à l'or ECL (0,5M de NaCl, 5 % de réactif de blocage; Amersham Bioscience) à 42° C pendant la nuit. On utilise l'ADNc codant l'YBP pour préparer une sonde. On visualise les signaux en utilisant le système de détection et de marquage de l'Acide Nucléique Direct ECL selon les instructions du fabricant (Amersham Bioscience).

Hybridation *in situ* :

On génère les sondes d'hybridation pour l'hybridation *in situ* par transcription *in vitro* avec la polymérase T7 ou T3 de l'ARN pour le marquage sens ou antisens de l'ARN avec la digoxigénine-UTP (Roche). On utilise l'ADNc codant l'YBP pour faire une ribosonde. On dissèque les ovaires nymphaux, on les extrait et on les rince avec une solution salée tamponnée au phosphate (PBS) refroidie dans de la glace. On fixe l'ovaire obtenu le 5^{ème} jour après la nymphose avec 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 1h, on le lave dans du PBS et on le déshydrate avec de l'éthanol pendant 7 h et du xylène pendant 10 min. On procède à l'inclusion en utilisant du paraplaste à 57° C pendant 10 min et on conserve le bloc obtenu à 4° C pendant la nuit. On réalise des coupes du bloc de paraplaste et on les monte sur des lames. On réhydrate les coupes dans du xylène pendant 5 min (2 fois) et puis on les incube avec différentes concentrations de solution d'éthanol (5 min chacune à 100 %, 90 %, 80 %, 70 % et 50 %) et finalement avec du PBS pendant 5 min (2 fois). On perméabilise le résultant avec du PBS contenant 5 µg / ml de protéinase K à température ambiante pendant 5 min. Puis, on les fixe dans de la paraformaldéhyde à 4 % pendant 3 min et on les rince brièvement avec du PBS. On hybride les coupes à 50° C pendant 16 h dans une solution contenant la ribosonde marquée DIG décrite ci-dessus, 50 % de formamide, 10 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 200 µg / ml d'ARNt, 10 % de sulfate de dextran, 10 µg / ml d'ADN de sperme de saumon traité aux ultrasons, 600 mM de NaCl, 0,25 % de SDS et 1 mM EDTA (pH 8,0). Après l'hybridation, on rince les coupes avec 5 × SSC à 50° C pendant 20 min et 50 % de formamide dans 2 × SSC à 50° C pendant 20 min.

et $0,2 \times \text{SSC}$ à 50°C pendant 20 min. Après le rinçage avec $0,1 \text{ M}$ de Tris-HCl (pH 8) on incube en utilisant un $1 \times$ réactif de blocage (KPL) pendant 10 min. puis avec la peroxydase (concentrée 1000 fois) conjuguée à un anticorps contre le DIG dans le même tampon à 4°C pendant la nuit. On détecte les signaux par le substrat de peroxydase TrueBlue (KPL) pendant 10 min.

RESULTATS ET DISCUSSION

Distribution tissulaire de l'ARNm d'YBP :

Nous avons déjà obtenu l'ADNc codant l'homologue d'YBP chez *B. mori* (souche d43) (Yamamoto et coll., 2005). La séquence d'acides aminés déduite d'YBP présente respectivement 85, 42, 41 et 40 % d'identité avec les YBP de *B. mori* (souche Kinshu $\times$ Showa), *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* et *Homo sapiens*. Les deux isoformes du ver à soie possèdent 85 % d'homologie entre elles, avec une diversité pour les zones C-terminales (Yamamoto et coll., 2005 ; Takiya et coll., 2004). On pense que les séquences C-terminales des YBP renforcent la capacité de l'activité de liaison de l'ARN ou de l'ADN (Jiang et coll., 1997). Nous avons constaté que le CSD responsable du mécanisme catalytique est fortement conservé dans la séquence en acides aminés d'YBP. Le CSD présente des homologies avec ceux de *B. mori* (souche Kinshu $\times$ Showa) (100 %), de *D. melanogaster* (82 %), d'*H. sapiens* (81 %) et de *X. laevis* (80 %).

Pour une meilleure compréhension du rôle physiologique d'YBP, nous avons examiné ici la présence de l'ARNm d'YBP dans différents tissus de la souche d43. On extrait tous les ARN de l'intestin moyen, du corps gras, de la glande séricigène, de l'ovaire et des testicules des larves de *B. mori*, le 3^{ème} jour du 5^{ème} âge et on les soumet à une hybridation Northern. L'hybridation Northern montre qu'on détecte une bande unique dans tous les échantillons de tissu analysés avec une taille moléculaire de 1,7 kb (Fig. 1). On a obtenu des résultats similaires chez le poisson Medaka, *Oryzias latipes*, l'YBP du poisson medaka s'exprimant dans différents tissus (Zend et coll., 2002). Chez le ver à soie, l'ARNm d'YBP s'exprime fortement dans l'intestin moyen et dans le corps gras le 3^{ème} jour du 5^{ème} âge. Nos résultats indiquent qu'YBP est une protéine omniprésente contenant le CSD.

Expression de l'ARNm d'YBP pendant l'ovogenèse :

Nous avons étudié le profil d'expression du transcript de 1,7 kb pendant l'ovogenèse. Comme le montre la Fig. 2B, on divise l'ovaire nymphal en huit stades (du stade 1 à 8, comme le montre la Fig. 2B). On a observé le développement des ovaires pendant le développement pre-adulte chez le ver à soie (Yamauchi & Yoshitake, 1984). On extrait l'ARN total à chaque stade de l'ovaire et on l'utilise pour l'hybridation Northern. Comme le montre la Fig. 2A, on détecte un transcript unique de 1,7 kb pendant l'ovogenèse. On localise les signaux les plus forts aux stades 1, 2 et 7. Aux stades 1 et 2, correspondent la formation et le développement des follicules pendant la previtellogenèse (Miya, 2003), tandis qu'on observe la maturation des ovaires de la nymphe aux stades 7 et 8 (Yamauchi & Yoshitake, 1984). Aux stades 7 et 8, les cellules folliculaires recouvrent l'ovocyte et la cellule nourricière dégénère (Yamauchi & Yoshitake, 1984). Dans l'ovaire, au stade 8, la production du chorion de l'œuf débute et il est difficile de préparer les coupes pour l'hybridation *in situ*. Le chorion de *B. mori* est une structure élaborée constituée de plus de 100 polypeptides différents qui sont produits et sécrétés par les cellules folliculaires pendant leur différenciation terminale (Kafatos et coll., 1995). Nous avons donc décidé d'utiliser l'ovaire au stade 7 pour une analyse ultérieure et pour examiner le rôle d'YBP à ce stade.

Hybridation *in situ* de l'ARNm d'YBP :

Pour étudier la localisation de l'ARNm d'YBP dans l'ovaire du ver à soie, on réalise une hybridation *in situ* avec une ribsonde sens / antisens (Fig. 3). On utilise l'ADNc d'YBP pour préparer ces sondes. Par comparaison aux résultats avec une sonde ADN, nous avons pu détecter des signaux plus importants et un bruit de fond plus bas avec une ribsonde (données non présentées). Dans

l'hybridation avec la sonde antisens, l'ARNm d'YBP se limite principalement aux cellules folliculaires, tandis qu'on ne détecte pas de signaux dans l'ovocyte. On n'observe pas de coloration de la section témoin traitée avec la sonde sens. Nos résultats suggèrent qu'YBP pourrait moduler l'expression de gènes spécifiques ou des ARNm à ce stade dans la cellule folliculaire. Comme nous l'avons décrit plus haut, la formation du chorion de l'œuf commence à la fin de l'ovogenèse et les protéines qui constituent le chorion sont synthétisées à ce moment là. On a rapporté que la zone du promoteur du gène du chorion contient un site de liaison de l'ADN C/EBP et la protéine de la famille C/EBP est impliquée dans l'expression spécifique du gène de chorion selon le stade (Sourmeli et coll., 2003). L'ARNm du chorion est traduit immédiatement sans phase d'accumulation pendant la choriogenèse, ce qui suggère qu'YBP pourrait contrôler l'expression de certains gènes du chorion, bien qu'il n'y ait pas de preuve que leurs zones du promoteur contiennent l'élément de la boîte Y.

Il se pourrait qu'YBP joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle dans d'autres tissus du ver à soie où YBP est présent. L'YBP de *B. mori* (souche Kinshu × Showa) renforce l'activité de liaison de la protéine de liaison modulatrice de la fibroïne vers sa séquence ADN cible dans la glande séricigène (Takiya et coll., 2004). Deux isoformes de la protéine de la boîte Y chez la souris sont liées à la zone 3' non traduite de l'ARNm de sa protamine pendant la spermatogenèse dans les testicules des souris (Davies et coll., 2000). L'YBP de *Xenopus* est associée au contrôle transcriptionnel du gène codant la serine / threonine kinase dans les ovocytes (Olive et coll., 1994). Dans ce contexte, il est nécessaire de chercher les gènes cibles ou l'ARNm pour l'YBP du ver à soie. Nous procédons à l'heure actuelle à l'essai de retardation sur gel et à l'immunoprécipitation afin d'examiner leurs cibles.

COMPARATIVE ANALYSIS OF CUTICLE PROTEINS OF THE SILKWORM BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

KOHIJI YAMAMOTO ^{1*}, PINGBO ZHANG ¹, YUTAKA BANNO ¹, FUMIO MIAKE ²,
KAZUHIRO NISHIKAWA ¹, AKIFUMI NISHISAKA ¹ & KEI TAMURA ¹

¹ Laboratories of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

² Microbiology Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka 814-0181, Japan.

Silkworm larvae have variety of cuticles in hardness, pigmentation and transparency. It has been known that one of silkworm mutants (oc strain) has translucent larval skin. In this study, we established analysis of specific proteins that relate to the transparency in cuticle of the silkworm with two-dimensional electrophoresis (2-DE). Cuticle proteins were compared between normal-type and oc strain by differential display, and specific proteins were detected. We found that one polypeptide was deficient in total protein of oc strain, which was identified as one of cuticle proteins of larval silkworm (accession number in SwissProt: O02387) by peptide mass mapping and N-terminal sequences. Furthermore, there is one polypeptide in total protein of normal-type, which is suggested to be a novel polypeptide. This is the first proteomic analysis on the silkworm cuticle and our data will provide new insights into the cuticle function of the silkworm.

Keywords: *Bombyx mori*; cuticle, proteomics, silkworm.

INTRODUCTION

For insects and other invertebrates, proteins of cuticle or exoskeleton play a variety of roles in the silkworm. Cuticle protein composition could have an influence on the properties of cuticle in insect. The silkworm, *Bombyx mori*, is an agriculturally important insect for silk production. Many silkworms up to 450 mutants have been reported, according to egg-shape, skin colour at larval stage and cocoon-shape (<http://kaiko.kyushu-u.ac.jp/index.html>). Thus, the genetic resources for *B. mori* make it possible to be a model animal for lepidopteran insects. After draft-sequence of silkworm genome was provided, post-genome analysis has been in progress in silkworm.

The silkworm larvae have variety of cuticles in hardness, pigmentation and transparency. Normal-type of silkworms has opaque larval skin, while one of silkworm mutants (*oc* strain) possess translucent larval skin. Although cuticle protein composition could contribute to the mechanical properties of cuticle in insect, the number of proteins derived from larval cuticles of the silkworm has been limited so far.

Here, we carried out a differential proteomic study to identify what kind of factors are involved in the construction of opaque larval skin in the silkworm. This proteomic approach using 2-DE, and

* Corresponding author: Kohji Yamamoto, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan. E-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp. Fax: +81-92-624-1011

matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) allows the comparison of protein contents in the cuticle of silkworms between normal-type (p50 strain) and *oc* strain.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm and cuticle sample:

The *B. mori* larvae (p50 strain and *oc* strain) were maintained and reared on mulberry leaves at the Institute of Genetic Resources of Kyushu University (Fukuoka, Japan). On day 3 at the 5th instar, cuticles were dissected in ice-cold 0.75 % NaCl. The integuments were separated with a spatula to remove fat body and muscle adhering to the cuticle. The resultant cuticles were washed twice in ice-cold 0.75 % NaCl and then blotted with filter paper to remove excess liquid. Extraction of cuticle protein was done at 4° C. Each cuticle was homogenized with liquid N₂ by mortar and pestle, and then was extracted with buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 3 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.5 mM pepstatin, 0.5 mM leupeptin, 0.02 mM chymostatin, 0.05 mM diisopropyl fluorophosphate, 8 M urea, 2 M thiourea, 4 % (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylanmonio]-1-propanesulfate, 0.03 M dithioerythritol, and 2 % (v/v) pH 3-10 Pharmalyte (Amersham Biosciences). After centrifugation at 15,000 × *g* for 15 min, the Bio-Rad protein assay kit using bovine serum albumin as a standard measured the protein concentration.

2-DE:

2-DE was performed essentially as described previously (Zhang *et al.* 2006). A portion of 150 µg of extracted polypeptides for every sample was loaded onto an IPG strip (Amersham Pharmacia Biotech), and then IEF was carried out with the Ettan IPGphor IEF system (Amersham Pharmacia Biotech) at 50 V for 12 h, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, 4000 V for 1 h, 6000 V for 1 h, and 8000 V for 10 h (a total of 90 000 V-h). Then, the strips were subjected to the second-dimensional gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) by transferring onto 15% polyacrylamide gels. Electrophoresis was done in a vertical slab gel apparatus (Eido, Japan) at 20mA *per gel* overnight at 4 ° C. After SDS-PAGE, polypeptides were visualized using modified silver stained method (Shevchenko *et al.* 1996).

MALDI-TOF/MS and peptide mass mapping (PMM) analysis:

The resulting 2-DE protein patterns were photographed using a Canon digital camera and assigned the apparent *Mr* and *pI* values using the program PDQuest (BioRad Laboratories, Hercules, CA) after silver staining as detailed above. The spots of interest were excised from the SDS-PAGE gel and were done in-gel digestion by the method previously reported (Zhang *et al.* 2004). Briefly, the excised gel was destained, rinsed with water, and incubated in 100% acetonitrile for 5 min. In-gel digestion was carried out by incubation with trypsin for overnight at 37 ° C. Resulting peptides were extracted with a solution containing 60% acetonitrile and 1%trifluoroacetic acid (TFA). Aliquots (1 µl) from the in-gel digestion were mixed with 1 µl of 10 mg/ml cyano-4-hydroxycinnamic acid (35% acetonitrile and 0.1% TFA). Measurements were calibrated externally and internally with a peptide mixture containing angiotensin I, angiotensin II, adrenocorticotrophic hormone, and peptide fragments arising from autoproteolysis of trypsin. All analyses were performed using a PerSeptive Biosystem MALDI-TOF Voyager-DE RPO Biospectrometry workstation (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). The workstation was operated in the delayed extraction (DE) and in a positive-ion linear mode with the following parameters: 20 kV acceleration voltage, 95% grid voltage, 100 ns delay time, and 500 *m/z* low mass gate. Peaks detected by mass spectrometry were subjected to SWISS-PROT database for search by MS-Fit software (<http://prospector.ucsf.edu>).

Sequencing of N-terminal amino acid and database search:

For sequencing of the N-terminal amino acid, the polypeptide resolved by 2-DE was transferred onto a Sequi-Blot PVDF membrane (Bio-Rad, Tokyo). The spot, stained with 0.01% Coomassie Blue R-250, was excised and subjected to sequence analysis. A database search was performed with the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTS AND DISCUSSION

The differences in protein spots between p50 and *oc* strain:

To investigate the pattern of proteins synthesized in the tissue, total proteins were prepared from cuticle of two-type of silkworm and subjected to 2-DE, followed by the staining with silver nitrate. Over pI and molecular mass ranges between pI 3 and 10 and between 14 and 94 kDa, respectively, we exhibited approximately 400 proteins spots by 2-DE (Fig. 1). With cuticle proteins differentially expressed between the opaque integument and the translucent one, the different spots could be related to formation of opaque larval skin. As shown in Fig. 1, basic pattern of cuticle proteins between the normal-type and the mutant was similar to each other in three replicates. We found significant spots in 2-DE pattern between the normal silkworm and translucent one. Spot C1 is present in p50 strain, whereas it is absent in *oc* strain. C1 was acidic and had a relatively small molecular mass. On the other hand, there is no spot C2 in *oc* strain, which is detected in p50 strain. The N-terminal sequences of two polypeptides were determined. Furthermore, spots of these polypeptides were excised from the gels and subjected to in-gel digestion with trypsin, mass spectroscopic analysis, and PMM analysis. There were also differences in spots other than C1 and C2 spots and all of them must be examined to understand which factors play part in the construction of opaque larval skin. For example, xanthine dehydrogenase has been recognized to play a crucial role in uric acid accumulation in the epidermis cells of opaque larval skin, whereas the enzyme is absent in translucent larval skin (Tamura, 1977; Tamura, 1983). Investigations along these lines are now underway in our laboratories.

N-terminal sequencing and PMM:

The N-terminal amino acid sequences of the unique proteins were determined by Edman degradation using automated sequencer. Polypeptides on 2-DE gel were electroblotted on PVDF membrane, followed by Coomassie Brilliant Blue staining. In N-terminal sequencing analysis, no chemical modification of the N-terminal sequence was detected. The sequence of C1 spot was DVSHIAKSDEYAAPVVKSSY. The protein databases were searched by BLAST for similar sequences. The N-terminal sequence of C1 spot overlapped with the sequence of *Bombyx mori* cuticle protein 17 (BMCP17, accession number in SwissProt: O02387) (Fig. 2). On the other hand, no sequence similar to the N-terminal sequence of C2 spot was found. In order to certificate the matching result of N-terminal sequencing, the overall sequence of C1 spot was further examined by the PMM method with the in-gel digestion by trypsin. The peptide fragments were resolved by MALDI-TOF/MS and compared with theoretical tryptic fragments of BMCP17 (Fig. 2). Including the overlapped sequence described above, the coverage of the matched sequence of C1 was 44.7 % of the sequence of BMCP17. The C2 spot was also applied to PMF analysis including in-gel digestion and MALDI-TOF/MS. The database search, however, revealed insufficient data, suggesting that it could be a novel polypeptide. The molecular size and isoelectric point of C1 spot are in good agreement with the theoretical values of BMCP17 (molecular size: 15,269 and isoelectric point: 4.93). The BMCP17 is one of the major cuticle proteins identified in the larval cuticle of the silkworm (Nakato *et al.* 1994, 1997; Shofuda *et al.* 1999). It showed high binding activity to chitin, however, its physiological role is still unclear (Togawa *et al.* 2004). We are in the process of further investigation of physiological role of the protein of interest by RNAi. Furthermore, differential display of mRNA expression has been challenged and compared with the results obtained from the proteomic strategies.

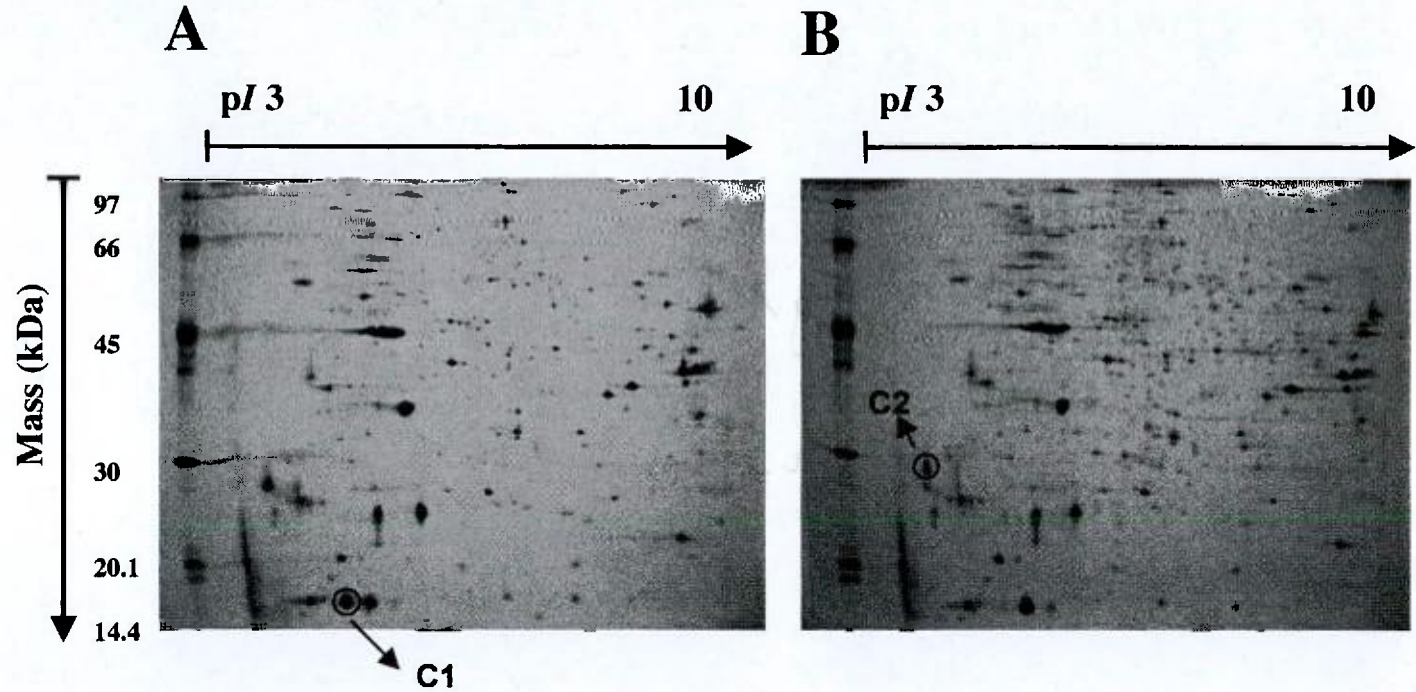


Fig. 1 2-DE of cuticle proteins from the p50 strain (A) and oc strain (B).

Polypeptides were extracted from cuticles and resolved by 2-DE at pI 3-10 and 14-97 kDa. Arrows and circles indicate polypeptide spots used for further analysis by the N-terminal sequence and PMM experiment.

Fig. 1. 2-DE des protéines de la cuticule de la souche p50 (A) et de la souche oc (B).

On extrait les polypeptides des cuticules et on les sépare par 2-DE à pI 3-10 et 14-97 kDa. Les flèches et les cercles indiquent les taches de polypeptides utilisées pour l'analyse ultérieure par la séquence du N-terminal et PMM.

```

1  ATGAAATTCTGATTGTCCTCGCCGTCGCGGTGCGGTGCGCAAGC 45
1  M   K   F   L   I   V   L   A   V   A   V   A   C   A   S   15

46  GCCGACGTTCTCCACATCGCCAAGTCTGACGAGTACGCCGCCCA 90
16  A   D   V   S   H   I   A   K   S   D   E   Y   A   A   P   30

91  GTGGTCAAATCCAGCTACGACATCACCCCTGAAGGCCACTTCCAG 135
31  V   V   K   S   S   Y   D   I   T   P   E   G   H   F   Q   45

136  TTCAACTACGAGACCGGCCAACGGAATTTACGCCCAGGCTGAAGGT 180
46  F   N   Y   E   T   G   N   G   I   Y   A   Q   A   E   G   60

181  GCCGTCAAGAACGTCAACTCAGAAATACCCCGGCCATCGAAGTTAAG 225
61  A   V   K   N   V   N   S   E   Y   P   A   I   E   V   K   75

226  GGTGCCTACAAGTACACTTCCCCTGACGGACAAACCCATCGACCTC 270
76  G   A   Y   K   Y   T   S   P   D   G   Q   P   I   D   L   90

271  GCCTACGTCGCTGACGAGAACGGTTACCAACCCCAAGGGAAGCCAT 315
91  A   Y   V   A   D   E   N   G   Y   Q   P   Q   G   S   H   105

316  CTGCCCAACCCTCACCCAATTCCCGAGGCGATCGCCCGCGCTCTT 360
106 L   P   T   P   H   P   I   P   E   A   I   A   R   A   L   120

361  GCCTACATCGAGGCCCAACCCCCCAAGCCCTCCGTCGTGGAAAGAA 405
121 A   Y   I   E   A   H   P   P   S   P   S   V   V   E   R   135

406  AAAGTCGTCGCCAACTTGTTAGGATAA
136 K   V   V   A   N   L   L   G   *

```

Fig. 2 Nucleotide, deduced amino acid sequence of BMCP17 and partial sequences of C1 spot.

Numberings are from the start codon and N-terminal of amino acid sequence, respectively. Asterisk reveals the termination codon. The N-terminal sequence of C1 spot is boxed. The fragments of C1 spot identified by PMM analysis are underlined.

Fig. 2. Séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique de BMCP17 et séquences partielles de la tache C1.

Les numérotations commencent respectivement à partir du codon de départ et du N-terminal de la séquence. L'astérisque révèle le codon de terminaison. La séquence N-terminale de la tache C1 est encadrée. Les fragments de la tache C1, identifiés par l'analyse PMM, sont soulignés.

In this study, we investigate proteins synthesized in larval cuticle by proteomic approach using 2-DE, and MALDI-TOF/MS. We identified different proteins involved in skin condition of the silkworm by PMM and N-terminal sequences. The C1 and C2 spots were detected by the comparative 2-DE. Based on our results, we conducted that the former was identified as BMCP17, the latter could be a novel polypeptide. Our finding showed that the differential proteomic approach allows the comparison of protein contents of silkworms between normal-type and mutant strain. The analysis presented here is a preliminary study and is an initial step towards a systematic proteomic analysis of the silkworm cuticle. The 2-DE protein pattern of the cuticle tissue would be useful as a standard for further comparative 2-DE analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Bio-resources project (RR2002) of the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan. We are greatly indebted to Mr. Kei-ichi Makizumi at the Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (Kaketsuken), Kumamoto, Japan for amino acid sequence analysis.

REFERENCES

- NAKATO H., SHOFUDA K., IZUMI S. & TOMINO S. (1994) Structure and developmental expression of a larval cuticle protein gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1218, 64-74.
- SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., & MANN M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- SHOFUDA K., TOGAWA T., NAKATO H., TOMINO S., IZUMI S. (1999) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a larval cuticle protein of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 122B, 105-109.
- TAMURA T. (1977) Deficiency in xanthine dehydrogenase activity in the og and og^t mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Sericultural Science of Japan.* 46, 113-119.
- TAMURA T. (1983) Deficiency in xanthine dehydrogenase activity in the oq oily mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Japanese Journal of Genetics.* 58, 165-168.
- TOGAWA T., NAKATO H. & IZUMI S. (2004) Analysis of the chitin recognition mechanism of cuticle proteins from the soft cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1059-1067.
- ZHANG P., ASO Y., YAMAMOTO K., BANNO Y., WANG Y., TSUCHIDA K., KAWAGUCHI Y. & FUJII H. (2006) Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics.* 6(8), 2586-99.
- ZHANG P., YAMAMOTO K., WANG Y., BANNO Y., FUJII H., MIAKE F., KASHIGE N. & ASO Y. (2004) Utility of dry gel from two-dimensional electrophoresis for peptide mass fingerprinting analysis of silkworm proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2148-2154.

ANALYSE COMPARATIVE DES PROTEINES DE LA CUTICULE DU VER A SOIE PAR ELECTROPHORESE EN DEUX DIMENSIONS

KOHJI YAMAMOTO^{1*}, PINGBO ZHANG, YUTAKA BANNO¹, FUMIO MIAKE²,
KAZUHIRO NISHIKAWA¹, AKIFUMI NISHISAKA¹ & KEI TAMURA¹

1. Laboratories of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japon.

2. Microbiology Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka 814-0181, Japon.

Les cuticules des larves de vers à soie sont différentes quant à leur dureté, leur pigmentation et transparence. On sait que la peau de la larve d'un des mutants du ver à soie (souche oc) est translucide. Dans cette étude, nous avons analysé les protéines spécifiques qui sont liées à la transparence de la cuticule du ver à soie par une électrophorèse en deux dimensions (2-DE). On compare les protéines de la cuticule du type normal et de la souche oc par visualisation différentielle et on détecte les protéines spécifiques. On a constaté qu'un polypeptide est déficient dans la souche oc, que l'on a identifié comme l'une des protéines de la cuticule de la larve de ver à soie (numéro d'exemplaire chez Swissprot : O02387) par cartographie en masse du peptide et les séquences du N-terminal. Par ailleurs, il existe un polypeptide parmi l'ensemble des protéines totales du type normal, que l'on pense être un nouveau polypeptide. Cette étude représente la première analyse protéomique de la cuticule du ver à soie et nos données apportent de nouveaux aperçus sur la fonction de la cuticule du ver à soie.

INTRODUCTION

Les protéines de la cuticule ou de l'exosquelette, que l'on trouve chez les insectes et d'autres invertébrés jouent un ensemble de rôles chez le ver à soie. La composition des protéines de la cuticule pourrait avoir une influence sur les propriétés de la cuticule chez l'insecte. Le ver à soie *Bombyx mori* est un insecte important sur le plan agricole pour la production de soie. On a observé de nombreux mutants du ver à soie jusqu'à 450, selon la forme de leur œuf, la couleur de la peau au stade larvaire et la forme des cocons (<http://kaiko.kyushu-u.ac.jp/index.html>). Compte tenu de ces ressources génétiques, *B. mori* peut donc être un animal modèle pour les insectes lépidoptères. Après avoir obtenu la séquence brouillon du génome, l'analyse post-génome est en cours chez le ver à soie.

Les larves du ver à soie présentent des cuticules variables quant à leur dureté, leur pigmentation et leur transparence. La larve de ver à soie du type normal a une peau opaque, tandis que la peau de la larve d'un des mutants du ver à soie (souche oc) est translucide. Bien que la composition des protéines de la cuticule puisse contribuer aux propriétés mécaniques de la cuticule de l'insecte, le nombre de protéines que l'on a obtenu des cuticules larvaires du ver à soie, est limité jusqu'à présent.

* Auteur auquel adresser la correspondance : Kohji Yamamoto, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan. E-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp. Fax: +81-92-624-1011

Nous avons réalisé, ici, une étude protéomique différentielle pour identifier quel est le type de facteurs impliqués dans l'opacité de la peau de la larve du ver à soie. Cette approche protéomique en utilisant la 2-DE et la MALDI-TOF / MS permet la comparaison des teneurs en protéines de la cuticule des vers à soie entre le type normal (souche p50) et la souche *oc*.

MATERIELS ET METHODES

Echantillon de ver à soie et de la cuticule :

On maintient et on élève les larves *B. mori* (souche p50 et souche *oc*) sur des feuilles de mûrier à l'*Institute of Genetic Resources* de l'Université de Kyushu (Fukoka, Japon). Le 3^{ème} jour du 5^{ème} âge, on dissèque les cuticules dans du NaCl à 0,75 % refroidi dans de la glace. On sépare les téguments avec une spatule pour enlever le corps gras et les muscles adhérent à la cuticule. On lave les cuticules obtenues deux fois dans du NaCl à 0,75 % refroidi dans de la glace et on les sèche sur du papier filtre pour enlever le liquide en excès. On procède à l'extraction des protéines de la cuticule à 4° C. On homogénéise chaque cuticule dans de l'azote liquide avec un piston et un pilon et on l'extrait avec un tampon contenant 20mM de Tris-HCl (pH 8), 3mM EDTA, 1 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyl, 0,5 mM de pepstatine, 0,5 mM de leupeptine, 0,02 mM de chymostatine, 0,05 mM de fluorophosphate de diisopropyl, 8 M d'urée, 2 M de thiourée, 4 % (p/v) 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1- de sulfate de propane, 0,03 M de dithioerythritol, et 2 % (v/v) de Pharmalyte pH 3-10 (Amersham Biosciences). Après centrifugation à 15 000 × g pendant 15 min, on mesure la concentration en protéines avec le kit de dosage des protéines Bio-rad utilisant l'albumine de sérum bovin comme étalon.

2-DE :

On réalise la 2-DE d'après les descriptions antérieures (Zhang et coll., 2006). On charge une part de 150 µg des polypeptides extraits pour chaque échantillon sur une bande IPG (Amersham Pharmacia Biotech) puis l'on procède à l'IEF avec le système Ettan IPGphor IEF (Amersham Pharmacia Biotech) à 50 V pendant 12 h, 500 V pendant 1 h, 1000 V pendant 1h, 4000 V pendant 1 h, 6000 V pendant 1 h et 8000 V pendant 10 h (un total de 90 000 V-h). Puis, on soumet les bandes à une électrophorèse de deuxième dimension dans des conditions de dénaturation (SDS-PAGE) en les transférant sur des gels de polyacrylamide à 15 %. On procède à l'électrophorèse dans un appareil vertical pour gel en bloc (Eido, Japon) à 20mA par gel pendant la nuit à 4° C. Après la SDS PAGE, on visualise les polypeptides en utilisant une méthode de coloration à l'argent modifiée (Shevchenko et coll., 1996).

MALDI-TOF/MS et analyse de la cartographie de masse des peptides (PMM) :

On photographie les schémas protéiques 2-DE obtenus en utilisant un appareil photo numérique Canon et on leur attribue les valeurs apparentes *Mr* et *pI* en utilisant le programme PDQuest (BioRad Laboratories, Hercules, CA) après la coloration à l'argent décrite plus haut. On excise les taches d'intérêt de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium et on les soumet à une digestion avec une méthode précédemment décrite (Zhang et coll., 2004). En bref, on décolore le gel excisé, on le rince avec de l'eau et on l'incube dans de l'acétonitrile à 100 % pendant 5 min. On procède à la digestion sur gel par incubation avec de la trypsine pendant la nuit à 37° C. On extrait les peptides obtenus avec une solution contenant 60 % d'acétonitrile et 1 % d'acide trifluoroacétique (TFA). On mélange les aliquotes (1 µl) obtenues par la digestion sur gel avec 1 µl de 10 mg / ml d'acide cyano-4-hydroxycinnamique (35 % d'acétonitrile et 0,1 % de TFA). On calibre les mesures extérieurement et intérieurement avec un mélange de peptides contenant de l'angiotensine I, de l'angiotensine II, de l'hormone adrénocorticotrope, et des fragments de peptide dérivés de l'autoprotéolyse de la trypsine. On réalise toute les analyses en utilisant un poste de travail de Biospectrométrie MALDI-TOF Voyager-DE RPO Perceptive Biosystem (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Le poste de travail est programmé sur une extraction retardée (DE) et un

mode linéaire pour les ions positifs avec les paramètres suivants : tension d'accélération de 20kV, tension de grille de 95 %, temps de délai 100 ns, et 500 *m/z* de faible masse. Les pics détectés par la spectrométrie de masse sont soumis à la base de données SWISS-PROT pour une recherche sur le logiciel MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>).

Séquençage des acides aminés N-terminal et recherche sur la base de données :

Pour le séquençage des acides aminés N-terminal, on transfère le polypeptide séparé par 2-DE sur une membrane Sequi-Blot PVDF (Bio-Rad, Tokyo). On excise la tache colorée avec du bleu de Coomassie et on la soumet à une analyse de séquence. On réalise une recherche sur base de données avec le programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTATS ET DISCUSSION

Différences concernant les taches de protéines entre la souche p50 et la souche *oc* :

Pour étudier le profil des protéines synthétisées dans le tissu, on prépare les protéines totales à partir de la cuticule des deux types de ver à soie et on les soumet à la 2-DE, suivie par une coloration avec du nitrate d'argent. Nous avons trouvé approximativement 400 taches protéiques avec la 2-DE (Fig. 1) du point isoélectrique et des masses moléculaires, compris respectivement entre pI 3 et 10 et entre 14 et 94 kDa.

Avec les protéines de la cuticule qui s'expriment de manière différentielle entre le tégument opaque et le tégument translucide, on peut associer les différentes taches à la formation de la peau opaque de la larve. Comme le montre la Fig. 1, le profil de base des protéines de la cuticule du type normal et du mutant sont similaires entre eux dans trois répétitions. Nous observons des taches significativement différentes dans le profil 2-DE entre le ver à soie normal et le translucide. La tache C1 est présente chez la souche p50 tandis qu'elle est absente de la souche *oc*. C1 est acide et a une masse moléculaire relativement petite. D'autre part, il n'y a pas de tache C2 chez la souche *oc*, tandis qu'on la détecte chez la souche p50. On détermine les séquences N-terminal des deux polypeptides. De plus, on excise les taches de ces polypeptides des gels et on les soumet à une digestion sur gel avec de la trypsine, une analyse spectroscopique de masse et une analyse PMM. Il existe d'autres différences que les taches C1 et C2 et on doit toutes les examiner pour comprendre quels facteurs jouent un rôle dans la construction de la peau opaque de la larve. Par exemple, il a été reconnu que la xanthine déshydrogénase joue un rôle crucial dans l'accumulation d'acide urique dans les cellules de l'épiderme de la larve opaque tandis que l'enzyme est absente chez la larve à la peau translucide (Tamura, 1977 ; Tamura, 1983). Des études dans ces directions sont actuellement en cours dans nos laboratoires.

Séquençage N-terminal et PMM :

On détermine les séquences N-terminales des acides aminés des protéines uniques par dégradation Edman en utilisant un séquenceur automatique. Les polypeptides sur un gel 2-DE sont électrobuvarqués sur une membrane PVDF, puis colorés au Bleu de Coomassie brillant. On ne détecte pas de modification chimique de la séquence N-terminale. La séquence de la tache C1 est DVSHIAKSDEYAAPVVKSSY. On cherche des séquences similaires dans les bases de données des protéines par BLAST. La séquence N-terminale de la tache C1 chevauche la séquence de la protéine 17 de la cuticule de *Bombyx mori* (BMCP17, no d'exemplaire chez SwissProt : O02387) (Fig. 2). D'autre part, on ne trouve pas de séquence similaire à la séquence N-terminale de la tache C2. Pour certifier le résultat correspondant du séquençage N-terminal, on examine à nouveau la séquence générale de la tache C1 par la méthode PMM avec une digestion sur gel par la trypsine. On sépare les fragments peptidiques par MALDI-TOF/MS et on les compare avec les fragments triptyques théoriques de BMCP17 (Fig. 2). La couverture de la séquence correspondante de C1, y compris la séquence de chevauchement décrite plus haut, est de 44,7 % de la séquence de BMCP17. On pratique

aussi l'analyse PMM pour la tache C2 y compris la digestion sur gel et MALDI-TOF / MS. Cependant, la recherche sur la base de données ne révèle pas de données suffisantes, ce qui suggère que cela pourrait être un nouveau polypeptide. La taille moléculaire et le point isoélectrique de la tache C1 concordent bien avec les valeurs théoriques de BMCP17 (taille moléculaire : 15,269 et point isoélectrique : 4,93). BMCP17 est l'une des principales protéines identifiées dans la cuticule de la larve du ver à soie (Nakato et coll., 1994, 1997 ; Shofuda et coll., 1999). Elle présente une activité de liaison élevée avec la chitine, cependant, son rôle physiologique n'est toujours pas clair (Togawa et coll., 2004). Nous sommes en train d'étudier plus en détail le rôle physiologique de la protéine d'intérêt par ARNi. De plus, nous avons comparé l'expression différentielle de l'ARNm avec les résultats obtenus par les stratégies protéomiques.

Dans cette recherche, nous avons étudié les protéines synthétisées dans la cuticule larvaire par l'approche protéomique en utilisant la 2-DE et la MALDI-TOF/MS. Nous avons identifié les différentes protéines impliquées dans la condition de la peau du ver à soie par PMM et avec les séquences N-terminales. On détecte les taches C1 et C2 d'après la 2-DE comparative. D'après nos résultats, nous identifions la première comme BMCP17 et l'autre pourrait être un nouveau polypeptide. Nos observations montrent que l'approche protéomique différentielle permet la comparaison de la teneur en protéines entre le type normal et la souche mutante du ver à soie. L'analyse présentée ici est une étude préliminaire et représente une première étape dans l'analyse protéomique systématique de la cuticule du ver à soie. Le profil protéique 2-DE du tissu de la cuticule serait utile comme norme pour des analyses 2-DE comparatives ultérieures.

ROLE OF MULBERRY NUTRITION ON MANIFESTATION OF POST COCOON CHARACTERS OF SELECTED RACES OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

FIRDOSE AHMAD MALIK & Y. SRINIVASA REDDY*

Department of Studies in Sericultural Science, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore - 570 006, India.

The manifestation of cocoon and post cocoon characters is dependent both on silkworm race and mulberry nutrition. Racial differences in the expression of quantitative traits have been well documented. The role of mulberry nutrition, on the expression of quantitative traits like post cocoon characters, has not been studied. Information on the expression of quantitative characters is required since raw silk quality is largely dependent on the metric traits of the core filament. In the present study, three silkworm races i.e., PM, NB₄D₂ and CSR₂ which are significantly different in the cocoon and post cocoon characters were fed on the leaves of three mulberry varieties namely V-1, S-36 and M-5 to evaluate the role of mulberry nutrition on the expression of post cocoon characters. The influence of leaf moisture and nutrients (which are significantly different in the three mulberry varieties) on cocoon and biomass production and expression of post cocoon characters has been studied.

Keywords: *Bombyx mori*, mulberry varieties, economic characters, silkworm races.

INTRODUCTION

The mulberry silkworm is monophagous, and derives water and nutrients from the mulberry leaf not only for its growth and development but also for cocoon production. Miyashita (1986) observed that leaf quality alone contributes to about 38.2% of success of cocoon crop. The role of mulberry nutrition on cocoon yield has been extensively studied (Sannappa *et al.*, 2005) but the investigations were limited to studies on yield gaps with mulberry varieties raised under different agro-climatic conditions (Datta, 1992).

The influence of mulberry nutrition on the quality characters of raw silk has not been evaluated. Quality characters of the raw silk play a significant role in raw silk export as the exportable raw silk has to meet high quality standards. A number of new races were evolved through conventional breeding technique applying selection pressure on desired traits, as qualitative and quantitative traits were considered as racial features. Besides the race, quality of leaf and environment also significantly influence the yield and raw silk quality (Naseema Begum *et al.*, 2004). The role of environment in the quality and quantity of silk produced was studied through seasonal performance of different silkworm races (Thiagarajan, 1994) but that of leaf quality on cocoon production and post cocoon characteristics has not been systematically studied.

* Correspondence to: Prof. Y. Srinivasa Reddy, DOS in Sericulture science, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore - 570 006, Tel: 0091-9448293656; Fax: 0091821-2419335. E-mail: ysr_yre@yahoo.com

In the present investigation, the leaves of mulberry varieties namely V-1, S-36 and M-5 were used for rearing three silkworm races i.e., PM, NB4D2 and CSR2. The leaves of V-1 are known for their high nutritive value and moisture retention capacity. The leaves of S-36 are known for their succulence and high moisture content, whereas the leaves of M-5 variety are relatively poor both in nutritive value and moisture content. Among the silkworm races, CSR2 is highly productive bivoltine with more than 20% of silk content in its shell whereas NB4D2 is a less productive bivoltine and PM is the least productive but survives on leaf of very poor quality. The three races, selected for their significant differences in the productivity and survival traits were fed on leaves of variable nutritive and moisture content, to generate information on the role of mulberry nutrition on manifestation of post cocoon characters in popular silkworm races which represent three base levels of performance i. e., poor, medium and good.

MATERIALS AND METHODS

The mulberry genotypes i. e., M-5, S36 and V-1 were planted in the mulberry garden of the department of sericulture in the University of Mysore, Mansagangotri, Mysore during 1998. The plots measured 5×4 meters with a planting space of 0.9 × 0.9 meters. The pH of the red sandy loamy soil used for plantation is 6.9. The experiment was laid out in randomized complete block design with three replications. Recommend doses of farm yard manure (FYM) of 20 MT/ha/yr for S-36 and M-5 plantation and 40 MT for V-1 plantation in two split doses, and chemical fertilizers at the rate of 300:120:120 kg of NPK for S-36 and M-5 plantation and 350:140:140 kg of NPK for V-1 plantation were applied. The chemical fertilizers were applied in five equal split doses of nitrogen and two each of phosphorus and potassium applied to 1st and 3rd crops. Around 1,136.25 m³ of water were provided per acre at intervals of 10 days in an approximately 70 day's crop period for plots of all the three mulberry varieties.

Biochemical composition of leaf:

The biochemical constituents of mulberry leaf like moisture content, total free amino acid, total protein and total anthrone positive substances (TAPS) were estimated in tender, medium and coarse leaves of dried samples of all the mulberry varieties.

Leaf moisture:

The moisture content of leaf was calculated by the formula and expressed in terms of percentage,

$$\text{Leaf moisture \%} = \frac{\text{Fresh wt. of the leaf (g)} - \text{Dry wt. of the leaf (g)}}{\text{Fresh wt. of the leaf (g)}} \times 100$$

Estimation of total free amino acids:

Total free amino acid content was estimated by following the method of Moore and Stein (1968) using tyrosine as standard. The total free amino acid content was expressed as mg of free amino acid /g dry wt. of leaf sample.

Estimation of total protein:

Leaf protein content was estimated by the method of Lowry *et al.*, (1951) using crystalline Bovine serum albumin (BSA) as standard and the values were expressed in terms of mg of protein/ g dry wt of leaf sample.

Total anthrone positive substances (TAPS):

Total anthrone positive substances (TAPS) of mulberry leaf were estimated by following the method of Steel *et al.* (1988) using glucose as standard. The total anthrone positive substances were expressed as mg of TAPS/ g dry wt of leaf sample.

Silkworm rearing:

Disease free layings (DFLs) of the three selected silkworm breeds i.e. PM, NB₄D₂ and CSR₂ were brushed and reared separately as per the standard rearing technique of Dandin *et al.* (2003) on fresh leaves of the mulberry varieties of V-1, S-36 and M-5. The experiment was conducted in summer season (March-April) when the ambient temperature was 30-35°C. At the beginning of 3rd instar only 300 larvae were retained in each replication for further rearing. At the end of rearing, cocoon weight, shell weight, shell percentage and silk productivity were recorded. Silk productivity is the quantity of silk synthesized as a function of larval duration in days of 5th instar larval development. The silk synthesized during 5th instar larval development only is used for spinning activity and bave production. It is important to consider it as an economic trait because the quantity of the silk synthesized and also the duration of silk synthesis are important parameters to be considered for determining the productive potential of a race. The two parameters differ significantly in different races and therefore silk productivity which is derived from them is used as an economic trait for considering the comparative performance of the three selected races.

Reeling process:

Fifty reelable cocoons (from 3 replications) were selected from PM, NB₄D₂ and CSR₂ reared separately on mulberry varieties of V-1, S-36 and M-5 and were subjected to reeling as per the standard technique (Takabayashi *et al.*, 1997). The cocoons were dried in a hot air oven for a period of 5 hours in a temperature profile of:

100°C (1 hour) → 90°C (1 hour) → 80°C (1 hour) → 70°C (1 hour) → 60°C (1 hour)

The cocoons were then conditioned at room temperature for 48 hours. Cocoon cooking was carried out by the three pan cooking system.

First pan: 45°C - 60 seconds.

Second pan: 65°C - 120 seconds.

Third pan: 95°C - 60 seconds.

The cocoons were cooled and brought to a reeling temperature of 40°C by sprinkling cold water. The cocoons were reeled using epprouvette having a circumference of one meter. The reeling speed was 120 to 150 meters/min. After the completion of reeling, the total length of the filament was recorded. The reeled silk was dried in a hot air oven at a temperature of 70°C for 24 hours. The silk filament was then transferred to desiccators for further moisture absorption before recording the weight of the silk.

The filament length, raw silk recovery, filament size, reelability, neatness and rendita were calculated at the end of reeling process by using the following formulae:

$$1) \text{ Filament length (m)} = \frac{\text{Total filament length}}{1 + \text{number of breaks}}$$

$$2) \text{ Denier} = \frac{\text{Conditioned weight of raw silk}}{\text{Total length of raw silk}} \times 9000$$

$$3) \text{ Reelability (\%)} = \frac{\text{Number of reeling cocoons}}{\text{Number of feeding ends}} \times 100$$

$$4) \text{ Raw silk recovery (\%)} = \frac{\text{Silk weight}}{\text{Shell weight}} \times 100$$

$$5) \text{ Raw silk percentage (\%)} = \frac{\text{Weight of raw silk reeled + converted silk weight of carry over cocoons}}{\text{Weight of cocoons taken for reeling}} \times 100$$

$$6) \text{ Rendita} = \frac{\text{Weight of the cocoons (kg)}}{\text{Weight of the raw silk reeled (kg)}} \times 100$$

7) Neatness:

The reeled silk was loaded in 10 panels and neatness points were scored by comparing with the standard values.

Statistical analysis:

Two-ways analysis of variance was used to test the significance of differences in the means of economic characters of the silkworm races reared on the mulberry varieties i.e., V-1, S-36 and M-5. Tukeys (1953) multiple comparison tests were used to find the significance of difference in the means between the races and mulberry varieties. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Biochemical composition of leaves of mulberry varieties:

The results on the biochemical composition of the mulberry leaf like moisture content, total free amino acid, total protein and total anthrone positive substances (TAPS) are presented in Table I.

Leaf moisture:

The mean moisture level of the tender, medium and coarse leaves (Table I) is relatively more in V-1 variety (76.20 %) followed by S-36 (74.54 %) and M-5 (72.47 %). In all the three varieties, the leaf moisture content was relatively more in tender (76.57 %) than medium (74.20 %) and coarse leaves (72.44 %). The interaction has shown that the tender leaf of V-1 has the highest moisture content (78.08 %) and coarse leaf of M-5 has least moisture content (70.29 %).

Total free amino acid:

The mean free amino acid levels of all the maturity levels of the leaf were highest in V1 (13.03 mg/g) followed by S-36 (11.87 mg/g) and M-5 (9.93 mg/g). The mean free amino acid levels in all the three varieties were relatively high in medium leaf (13.53 mg/g) followed by coarse (12.59 mg/g) and tender leaves (8.72 mg/g). The highest level of total free amino acid was therefore observed in the medium leaves of V-1 variety (14.59mg/g) and least in tender leaves of M-5 variety (8.09mg/g).

Total protein:

The mean levels of the total protein were relatively highest in V-1 (233.2 mg/g) followed by S-36 (225.5 mg/g) and M-5 (200.4 mg/g). The mean total protein level was relatively highest in the tender leaf (241.57 mg/g) followed by medium (217.3 mg/g) and coarse leaf (200.35 mg/g). The tender leaf of V-1 had the highest protein level of (252.6 mg/g) whereas the coarse leaves of M-5 had the least protein level (183.6 mg/g) among the leaves of different maturity level.

Table I. Biochemical constituents of the selected mulberry varieties under irrigated conditions. (Values expressed as mean $\pm$ SD of three separate observations).**Tableau I. Constituants biochimiques des variétés de mûrier sélectionnées dans des conditions d'irrigation (Valeurs exprimées en tant que moyenne $\pm$ l'écart type pour trois observations séparées).**

Treatments	Leaf moisture (%)	Free amino acids (mg/g dry wt.)	Total protein (mg/g dry wt.)	Total Anthrone positive substances (mg/g dry wt.)
Traitements	Humidité de la feuille (%)	Acides aminés libres (mg / g de poids sec)	Protéines totales (mg / g de poids sec)	Substances positives totales à l'anthrone (mg / g de poids sec)
Variety / Variété				
1. V-1	76.20 ^c $\pm$ 1.64	13.03 ^c $\pm$ 2.96	233.2 ^c $\pm$ 16.90	82.90 ^c $\pm$ 7.28
2. S-36	74.54 ^b $\pm$ 1.85	11.87 ^b $\pm$ 2.27	225.5 ^b $\pm$ 19.23	80.69 ^b $\pm$ 7.07
3. M-5	72.47 ^a $\pm$ 2.03	9.93 ^a $\pm$ 1.46	200.4 ^a $\pm$ 18.15	75.01 ^a $\pm$ 5.00
F-test	162.1	220.7	4026.8	551.7
Maturity level / Niveau de maturité				
1. Tender / Tendre	76.57 ^c $\pm$ 1.50	8.72 ^a $\pm$.513	241.5 ^c $\pm$ 13.39	71.62 ^a $\pm$ 2.43
2. Medium / Moyen	74.20 ^b $\pm$ 1.67	13.53 ^b $\pm$ 1.86	217.3 ^b $\pm$ 18.02	80.66 ^b $\pm$ 3.34
3. Coarse / Brute	72.44 ^a $\pm$ 1.82	12.59 ^c $\pm$ 1.79	200.3 ^a $\pm$ 13.26	86.33 ^c $\pm$ 4.93
F-test	200.6	584.9	5888.3	1832.9
Interaction				
1. V-1 $\times$ Tender V-1 $\times$ Tendre	78.08 $\pm$ 0.75	9.18 $\pm$ 0.06	252.6 $\pm$ 0.58	74.19 $\pm$ 0.37
2. V-1 $\times$ Medium V-1 $\times$ Moyen	76.09 $\pm$ 0.15	15.59 $\pm$ 0.49	233.5 $\pm$ 1.58	83.57 $\pm$ 0.48
3. V-1 $\times$ Coarse V-1 $\times$ Brut	74.41 $\pm$ 0.12	14.32 $\pm$ 0.49	213.6 $\pm$ 0.64	90.94 $\pm$ 0.61
4. S-36 $\times$ Tender S-36 $\times$ Tendre	76.75 $\pm$ 0.54	8.88 $\pm$ 0.29	248.2 $\pm$ 0.98	71.95 $\pm$ 0.62
5. S-36 $\times$ Medium S-36 $\times$ Moyen	74.26 $\pm$ 0.05	13.61 $\pm$ 0.44	224.6 $\pm$ 0.58	82.10 $\pm$ 0.47
6. S-36 $\times$ Coarse S-36 $\times$ Brut	72.61 $\pm$ 0.54	13.11 $\pm$ 0.21	203.8 $\pm$ 0.61	88.04 $\pm$ 0.70
7. M-5 $\times$ Tender M-5 $\times$ Tendre	74.89 $\pm$ 0.66	8.09 $\pm$ 0.061	223.9 $\pm$ 0.48	68.72 $\pm$ 0.64
8. M-5 $\times$ Medium M-5 $\times$ Moyen	72.24 $\pm$ 0.12	11.37 $\pm$ 0.24	193.9 $\pm$ 0.57	76.32 $\pm$ 0.10
9. M-5 $\times$ Coarse M-5 $\times$ Brut	70.29 $\pm$ 0.28	10.34 $\pm$ 0.11	183.6 $\pm$ 0.60	80.00 $\pm$ 0.38
F-test / Test - F	0.948	23.9	54.7	26.0

Means with different superscripts are significantly different from each other for various mulberry varieties and leaf maturity level (as indicated by Tukeys HSD) / Les moyennes avec différents exposants sont significativement différentes les unes des autres pour les différentes variétés de mûrier et les différents niveaux de maturité de la feuille (d'après l'HSD de Tukeys).

Total anthrone positive substances (TAPS) :

The mean levels of the TAPS were relatively highest in V-1 (82.90 mg/g) followed by S-36 (80.69 mg/g) and M-5 (75.01 mg/g). At different maturity levels, the coarse leaf had relatively highest levels of TAPS (86.33 mg/g) followed by medium (80.66 mg/g) and tender leaves (71.62 mg/g). In different interactions, coarse leaf of V-1 had the highest level of TAPS (90.94 mg/g) whereas the tender leaf of M-5 had the least levels of TAPS (68.72 mg/g).

Economic characters:

The results on economic traits of silkworm races reared on different mulberry varieties are presented in Tables II-III.

Cocoon weight:

The mean cocoon weight of all the races was the highest in the larval batches fed with V-1 variety (1.524 g) followed by S-36 (1.457 g) and M-5 (1.316 g). NB4D₂ showed the highest mean cocoon weight (1.647 g) among the three races followed by CSR₂ (1.617 g) and PM (1.033 g). A significant increase in the cocoon weight was noticed in NB4D₂ on V-1 (1.824g) followed by S-36 (1.658 g) and M-5 (1.460 g) and in CSR₂ on V-1 (1.684 g) followed by S-36 (1.650 g) and M-5 (1.518 g). In PM, the cocoon weight observed on V-1 (1.065 g) and S-36 (1.064 g) was significantly higher than on M-5 (0.970 g).

Shell weight:

The mean shell weight of all the races was relatively highest on V-1 (0.304 g) followed by S-36 (0.267 g) and M-5 (0.216 g). CSR₂ showed a relatively higher mean shell weight (0.347 g) than NB4D₂ (0.302 g) and PM (0.137 g). A significant increase in the shell weight was observed in CSR₂ on V-1 (0.401 g) compared to S-36 (0.348 g) and M-5 (0.294 g) and in NB4D₂ on V-1 (0.355 g) followed by S-36 (0.309 g) and M-5 (0.242 g). In PM also, the highest shell weight was observed on V-1 (0.155 g) than on S-36 (0.144 g) and M-5 (0.113 g).

Shell ratio:

The mean shell ratio of all the races was relatively high on V-1 (19.29 %) followed by S-36 (17.87 %) and M-5 (15.86 %). CSR₂ showed a relatively higher shell ratio (21.54 %) followed by NB4D₂ (18.22 %) and M-5 (13.26 %). A significant increase in the shell ratio was observed in CSR₂ on V-1 (23.83%) followed by S-36 (21.39 %) and M-5 (19.40 %). NB4D₂ showed a relatively higher shell ratio on V-1 (19.50%) and S-36 (18.65 %) than on M-5 (16.53 %). PM also showed a higher shell ratio on V-1 (14.55 %) and S-36 (13.58%) more than on M-5 (11.66 %).

Silk productivity:

The mean silk productivity of all the races was more on V-1 (4.790 cg/day) followed by S-36 (4.291 cg/day) and M-5 (2.884 cg/day). The CSR₂ showed a relatively higher mean silk productivity (5.302 cg/day) than NB4D₂ (4.715 cg/day) and PM (1.947 cg/day). A relatively higher increase in the silk productivity was noticed in CSR₂ on V-1 (6.463cg/day) followed by S-36 (5.726 cg/day) and M-5 (3.716 cg/day). NB4D₂ showed a relatively higher silk productivity on V-1 (5.720 cg/day) than on S-36 (4.993 cg/day) and M-5 (3.433 cg/day). In multivoltine PM, a significantly higher silk productivity was observed on V-1 (2.186 cg/day) than on S-36 (2.153 cg/day) and M-5 (1.503 cg/day).

Table II. Effect of mulberry nutrition on the economic traits of three selected silkworm races (Each value is the mean $\pm$ SD of 3 separate observations).

Tableau II. Effet de la nutrition sur les caractères économiques de trois races de vers à soie sélectionnées (chaque valeur est la moyenne $\pm$ l'écart type pour 3 observations séparées).

Treatments	Cocoon Weight	Shell Weight	Shell Ratio	Silk Productivity (cg/day)
Traitements	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Productivité de la soie (cg/jour)
Mulberry variety / Variété de mûrier				
1. V-1	1.524 ^c $\pm$ 0.35 (15.80)	0.304 ^c $\pm$ 0.11 (40.74)	19.29 ^c $\pm$ 4.03 (21.62)	4.790 ^c $\pm$ 1.97 (66.08)
2. S-36	1.457 ^b $\pm$ 0.29 (10.71)	0.267 ^b $\pm$ 0.09 (23.61)	17.87 ^b $\pm$ 3.43 (12.67)	4.291 ^b $\pm$ 1.63 (48.78)
3. M-5	1.316 ^a $\pm$ 0.26	0.216 ^a $\pm$ 0.08	15.86a $\pm$ 3.39	2.884 ^a $\pm$ 1.04
F-test	239.4	538.9	354.7	3142.7
Silkworm race / Race de ver à soie				
1. PM	1.033 ^a $\pm$ 0.04	0.137 ^a $\pm$ 0.01	13.26 ^a $\pm$ 1.32	1.947 ^a $\pm$ 0.35
2. NB ₄ D ₂	1.647 ^c $\pm$ 0.16	0.302 ^b $\pm$ 0.05	18.22 ^b $\pm$ 1.34	4.715 ^b $\pm$ 1.04
3. CSR ₂	1.617 ^b $\pm$ 0.78	0.347 ^c $\pm$ 0.04	21.54 ^c $\pm$ 1.92	5.302 ^c $\pm$ 1.22
F-test / Test F	2544.9	3424.4	2068.4	10329.9
Interaction				
1. PM $\times$ V-1	1.065 $\pm$ 0.00 (9.79)	0.155 $\pm$ 0.00 (37.16)	14.55 $\pm$ 0.53 (24.78)	2.186 $\pm$ 0.05 (45.44)
2. PM $\times$ S-36	1.064 $\pm$ 0.00 (9.69)	0.144 $\pm$ 0.00 (27.34)	13.58 $\pm$ 0.23 (16.46)	2.153 $\pm$ 0.05 (43.24)
3. PM $\times$ M-5	0.970 $\pm$ 0.00 -	0.113 $\pm$ 0.00	11.66 $\pm$.33	1.503 $\pm$ 0.05
4. NB ₄ D ₂ $\times$ V-1	1.824 $\pm$ 0.02 (24.93)	0.355 $\pm$ 0.00 (46.69)	19.50 $\pm$ 0.10 (1796)	5.720 $\pm$ 0.05 (66.61)
5. NB ₄ D ₂ $\times$ S-36	1.658 $\pm$ 0.04 (13.56)	0.309 $\pm$ 0.00 (27.68)	18.65 $\pm$ 0.23 (12.82)	4.993 $\pm$ 0.12 (45.44)
6. NB ₄ D ₂ $\times$ M-5	1.460 $\pm$ 0.02	0.242 $\pm$ 0.00	16.53 $\pm$ 0.31	3.433 $\pm$ 0.03
7. CSR ₂ $\times$ V-1	1.684 $\pm$ 0.02 (10.93)	0.401 $\pm$ 0.00 (36.39)	23.83 $\pm$ 0.16 (22.83)	6.463 $\pm$ 0.04 (73.92)
8. CSR ₂ $\times$ S-36	1.650 $\pm$ 0.00 (8.69)	0.348 $\pm$ 0.01 (18.36)	21.39 $\pm$ 0.05 (10.25)	5.726 $\pm$ 0.02 (54.09)
9. CSR ₂ $\times$ M-5	1.518 $\pm$ 0.02	0.294 $\pm$ 0.00	19.40 $\pm$ 0.17	3.716 $\pm$ 0.03
F-test / Test F	34.9	37.9	10.2	324.6

Mean values with different superscripts are significantly different from each other for various races and treatments (as indicated by Tukeys HSD) (Values in parenthesis indicate percent change over control) / Les valeurs moyennes avec les différents exposants sont significativement différentes les unes des autres pour les différentes races et les différents traitements (comme l'indique l'HSD de Tukey) (Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de changement par rapport au témoin).

Table III. Effect of mulberry nutrition on post-cocoon parameters of three selected silkworm races (Each value is the mean $\pm$ SD of 3 separate observations).

Tableau III. Effet de la nutrition sur les paramètres post-cocon de trois races de vers à soie sélectionnées (chaque valeur est la moyenne $\pm$ l'écart type pour 3 observations séparées).

<i>Treatments</i>	<i>Filament length</i>	<i>Filament size</i>	<i>Reelability</i>	<i>Raw silk percentage</i>	<i>Raw silk recovery</i>	<i>Neatness</i>	<i>Rendita</i>
<i>Traitements</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre du filament (Denier)</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Pourcentage de soie grège (%)</i>	<i>Rentrée de soie grège (%)</i>	<i>Netteté (points)</i>	<i>Rendement à la bassine</i>
Mulberry variety / Variété de mûrier							
1. V-1	929 ^c $\pm$ 255 (15.26)	2.81 ^c $\pm$ 0.21 (21.12)	85.0 ^c $\pm$ 1.93 (29.02)	14.1 ^c $\pm$ 3.54 (19.08)	78.83 ^b $\pm$ 2.91 (19.98)	91.6 ^c $\pm$ 2.34 (5.7)	7.61 ^a $\pm$ 2.29 (-1.8)
2. S-36	904 ^b $\pm$ 256 (12.15)	2.64 ^b $\pm$ 0.11 (13.79)	80.5 ^b $\pm$ 3.28 (22.26)	13.54 ^b $\pm$ 3.39 (14.35)	78.44 ^b $\pm$ 2.42 (19.39)	89.6 ^b $\pm$ 2.34 (3.4)	8.25 ^b $\pm$ 2.11 (-9.5)
3. M-5	806 ^a $\pm$ 252	2.32 ^a $\pm$ 0.39	65.8 ^a $\pm$ 3.95	11.84 ^a $\pm$ 3.01	65.70 ^a $\pm$ 7.95	86.6 ^a $\pm$ 2.78	9.04 ^c $\pm$ 2.23
F-test	415.5	159.187	231.4	762.7	338.3	57.0	178.8
Silkworm race / Race de ver à soie							
1. PM	542 ^a $\pm$ 56.3	2.21 ^a $\pm$ 0.21	76.5a $\pm$ 5.81	9.31 ^a $\pm$ 0.45	71.38 ^a $\pm$ 11.6	86.6 ^a $\pm$ 2.34	10.9 ^c $\pm$ 0.47
2. NB ₄ D ₂	1020 ^b $\pm$ 44.4	2.95 ^c $\pm$ 0.41	77.4a $\pm$ 10.1	13.26 ^b $\pm$ 1.61	72.77 ^b $\pm$ 4.27	89.3 ^b $\pm$ 2.78	8.03 ^b $\pm$ 1.04
3. CSR-2	1077 ^c $\pm$ 70.8	2.62 ^b $\pm$ 0.37	77.4a $\pm$ 10.8	16.91 ^c $\pm$ 1.01	78.80 ^c $\pm$ 3.83	92.0 ^c $\pm$ 1.93	5.92 ^a $\pm$ 0.42
F-test	8446.7	352.2	0.610	7979.2	147.7	64.0	2218.8
Interaction							
1. PM $\times$ V-1	591 $\pm$ 9.8 (26.01)	2.48 $\pm$ 0.12 (21.56)	83.0 $\pm$ 1.0 (18.57)	9.70 $\pm$ 0.10 (11.11)	75.43 $\pm$ 0.96 (34.79)	89.0 $\pm$ 1.00 (5.9)	10.5 $\pm$ 0.20 (-9.1)
2. PM $\times$ S-36	566 $\pm$ 8.1 (20.68)	2.10 $\pm$ 0.01 (2.94)	76.6 $\pm$ 2.5 (9.5)	9.50 $\pm$ 0.10 (8.82)	75.70 $\pm$ 1.05 (35.27)	87.0 $\pm$ 1.00 (3.5)	10.7 $\pm$ 0.15 (-7.1)
3. PM $\times$ M-5	469 $\pm$ 13.0	2.04 $\pm$ 0.04	70.0 $\pm$ 1.0	8.73 $\pm$ 0.15	55.96 $\pm$ 1.49	84.0 $\pm$ 1.00	11.5 $\pm$ 0.25

Table III. (Continued).

Tableau III. (Suite).

<i>Treatments</i>	Filament length	Filament size	Reelability	Raw silk percentage	Raw silk recovery	Neatness	Rendita
<i>Traitements</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre du filament (Denier)</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>Pourcentage de soie grège (%)</i>	<i>Rentrée de soie grège (%)</i>	<i>Netteté (points)</i>	<i>Rendement à la bassine</i>
4. NB ₄ D ₂ × V-1	1061 ± 7.6 (9.94)	3.06 ± 0.04 (8.51)	85.0 ± 1.0 (32.13)	14.80 ± 0.10 (32.14)	79.46 ± 1.46 (18.25)	92.0 ± 1.00 (6.9)	6.80 ± 0.10 (- 35.29)
5. NB ₄ D ₂ × S-36	1035 ± 11.5 (7.20)	2.97 ± 0.02 (5.31)	83.0 ± 1.0 (29.02)	13.80 ± 0.10 (23.21)	78.73 ± 1.00 (17.15)	90.0 ± 1.00 (4.6)	8.10 ± 0.10 (- 13.49)
6. NB ₄ D ₂ × M-5	965 ± 13.7	2.82 ± 0.05	64.3 ± 4.0	11.20 ± 0.10	67.20 ± 1.05	86.0 ± 1.00	9.20 ± 0.10
7. CSR ₂ × V-1	1135 ± 5.8 (15.34)	2.89 ± 0.08 (37.61)	87.0 ± 1.0 (37.37)	17.80 ± 0.10 (14.10)	81.60 ± 1.17 (10.37)	94.0 ± 1.00 (4.4)	5.46 ± 0.15 (- 17.08)
8. CSR ₂ × S-36	1111 ± 3.7 (12.90)	2.86 ± 0.03 (36.19)	82.0 ± 1.0 (32.48)	17.33 ± 0.15 (11.08)	80.89 ± 1.00 (9.41)	92.0 ± 1.00 (2.1)	5.89 ± 0.09 (- 8.6)
9. CSR-x M-5	984 ± 7.9	2.10 ± 0.01	63.3 ± 2.5	15.60 ± 0.20	73.93 ± 1.56	90.0 ± 1.00	6.40 ± 0.20
F-test / Test - F	8.5	35.5	10.6	84.1	26.1	1.0	21.7

Mean values with different superscripts are significantly different from each other for various races and treatments (as indicated by Tukeys HSD) (Values in parenthesis indicate percent change over control) / Les valeurs moyennes avec différents exposants sont significativement différentes les unes des autres pour les différentes races et les différents traitements (comme l'indique l'HSD de Tukeys) (Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de changement par rapport au témoin).

Filament length:

The average filament length of all the races were relatively more on V-1 (929 m) followed by S-36 (904 m) and M-5 (806 m). The highest mean filament length of all the races was observed in CSR₂ (1077 m) followed by NB₄D₂ (1020 m) and PM (542 m). A significant increase in the filament length was observed in CSR₂ on V-1 (1135 m) followed by S-36 (1111 m) and M-5 (984 m). NB₄D₂ showed a relatively higher filament length on V-1 (1061 m) and S-36 (1035 m) than on M-5 (965 m). PM also showed a higher filament length on V-1 (591 m) than on S-36 (566 m) and M-5 (469 m).

Filament size:

The average filament size of all the races were relatively more on V-1 (2.81) followed by S-36 (2.64) and on M-5 (2.32). Among the races of silkworm, NB₄D₂ showed a relatively higher mean filament size (2.95) followed by CSR₂ (2.62) and PM (2.21). A significant increase in the filament size was observed in NB₄D₂ on V-1 (3.06) followed by S-36 (2.97) and M-5 (2.82). CSR₂ showed a relatively higher filament size on V-1 (2.89) and S-36 (2.86) than on M-5 (2.10). PM also showed a higher filament size on V-1 (2.48) and S-36 (2.10) more than on M-5 (2.04).

Reelability:

The mean reelability % of all the races was relatively more on V-1 (85.00) followed by S-36 (80.55) and M-5 (65.88). There was no significant difference in the mean reelability of CSR₂ (77.44), NB₄D₂ (77.44) and PM (76.55). A significant increase in the reelability was observed in CSR₂ on V-1 (87.00) followed by S-36 (82.00) and M-5 (63.33). NB₄D₂ showed a relatively higher reelability on V-1 (85.00) and S-36 (83.00) more than on M-5 (64.33). PM also showed a higher reelability on V-1 (83.00) and S-36 (76.66) more than on M-5 (70.00).

Raw silk percentage:

The mean raw silk percentages were relatively more on V-1 (14.10) followed by S-36 (13.54) and M-5 (11.84). Among the races of silkworm, CSR₂ showed a relatively higher raw silk percentage (16.91) followed by NB₄D₂ (13.26) and PM (9.31). A significant increase in the raw silk percentage was observed in CSR₂ on V-1 (17.80) and S-36 (17.33) more than on M-5 (15.60). NB₄D₂ showed a relatively higher raw silk percentage on V-1 (14.80) and S-36 (13.80) followed by M-5 (11.20). PM also showed a higher raw silk percentage on V-1 (9.70) and S-36 (9.50) more than on M-5 (8.73).

Raw silk recovery:

There was no significant difference in the mean raw silk recovery between V-1 (78.83 %) and S-36 (78.44 %) whereas raw silk recovery was significantly less with M-5 (65.70 %). Among the races of silkworm, CSR₂ showed the relatively highest raw silk recovery (78.80 %) followed by NB₄D₂ (72.77 %) and PM (71.38 %). A significant increase in the raw silk recovery was observed in CSR₂ on V-1 (81.60 %) followed by S-36 (80.89 %) and M-5 (73.93 %). NB₄D₂ showed a relatively higher raw silk recovery on V-1 (79.46 %) and S-36 (78.73 %) more than on M-5 (67.20 %). PM also showed a higher raw silk recovery on S-36 (75.70 %) and V-1 (75.43 %) more than on M-5 (55.96 %).

Neatness:

The average neatness of all the races was relatively more on V-1 (91.6) followed by S-36 (89.6) and M-5 (86.6). The highest mean neatness among the races was observed in CSR₂ (92.0) followed by NB₄D₂ (89.3) and PM (86.6). A significant increase in the neatness was observed in CSR₂ on V-1 (94.00) followed by S-36 (92.0) and M-5 (90.0). NB₄D₂ showed a relatively higher neatness on V-1 (92.00) and S-36 (90.00) more than on M-5 (86.0). PM also showed the highest neatness on V-1 (89.0) followed by S-36 (87.0) and M-5 (84.0).

Rendita:

The mean rendita of all the races was found to be significantly higher on M-5 (9.04 kg) followed by S-36 (8.25 kg) and V-1 (7.61 kg). Among the races of the silkworm, PM showed relatively a higher mean rendita (10.9 kg) than NB4D2 (8.03 kg) and CSR₂ (5.92 kg). A significant increase in the rendita was observed in PM on M-5 (11.5 kg) followed by S-36 (10.7 kg) and V-1 (10.5 kg). NB4D2 showed a relatively higher rendita on M-5 (9.20 kg) and S-36 (8.10 kg) than on V-1 (6.80 kg). CSR₂ also showed a higher rendita on M-5 (6.40 kg) than on S-36 (5.89 kg) and V-1 (5.46 kg).

DISCUSSION

The leaves of three mulberry varieties showed a significant variation in biochemical composition with respect to major nutrients like total free amino acid, total protein and total anthrone positive substances (TAPS) and leaf moisture content. The biochemical composition also varies with the maturity levels of the leaf. When the means of all the three maturity levels were considered, the leaf moisture and biochemical constituents studied were relatively highest in V-1 followed by S-36 and M-5 (Table I). In the three mulberry varieties at different maturity levels an inverse relationship between free amino acid and total proteins on one hand and TAPS and total proteins on the other is apparent. For example tender leaf showed highest protein mean levels (241.5 mg/g) and least free amino acid levels (8.72 mg/g) and TAPS (71.60 mg/g) whereas coarse leaf showed least protein level (200.3 mg/g) and highest TAPS (86.3 mg/g). Free amino acid levels provide the raw material for the protein biosynthesis utilizing the energy provided by TAPS which serve as major fuel reserve. The biochemical composition of the leaf clearly shows the superiority of leaf of V-1 and S-36 variety over M-5. The leaves of V-1, S-36 showed biomass of 5.60 and 5.18 g/leaf respectively while the leaf of M-5 showed a biomass of 4.0 g/leaf. A significant variation was also observed in leaf yield of the three mulberry varieties in red sandy loamy soil receiving recommended dose of fertilizer and water. The average leaf yield is 60 MT/ha/yr and 40 MT/ha/yr in case of V-1 and S-36 respectively whereas it is 35 MT/ha/yr in the case of M-5. Such high yield and high moisture content of the leaf in V-1 and S-36 utilizes soil nitrogen and moisture content at a faster rate and therefore higher doses of both FYM and chemical fertilizers and better irrigation are recommended to sustain the yield levels of V-1 and S-36 mulberry plantations. The studies conducted so far were limited to higher yield levels of the elite mulberry varieties but no systematic studies on the impact of mulberry nutrition on cocoon productivity and post cocoon characters were conducted.

Cocoon production and post cocoon characters are significantly influenced by mulberry nutrition. The mean cocoon weights of all the races are significantly higher with V-1 mulberry variety than with S-36 and M-5 (Table II). The cocoon weight was significantly different with the three mulberry varieties in NB4D2 and was in the order V-1 > S-36 > M-5. The difference in the cocoon weights of PM (known for its low productivity) on V-1 and S-36 was not significant, though significantly higher than the cocoon weight with M-5. Similarly, the mean levels of cocoon weights in CSR₂ did not show significant difference between V-1 and S-36 but were significantly higher than on M-5.

The increase in cocoon weight in NB4D2 with V-1 and S-36 is contributed by significant increases in both pupal weight and shell weight whereas in the case of PM and CSR₂, a relatively greater increase in shell weight than in pupal weight was observed (Table II). Mulberry nutrition is utilized for both somatic and silk gland growth in NB4D2 whereas in PM and CSR₂, the nutritive leaves of V-1 and S-36 were more utilized for silk gland growth than for somatic growth. Gokulamma (2005) observed higher protein content in tender, medium and coarse leaves of V-1 and S-36 than in M-5 in all the seasons of the year. The higher protein content in V-1 and S-36 is utilized for silk protein biosynthesis in all the three races leading to a significant increase in shell weight. The observation is corroborated by results on shell ratio which showed relatively more increase in PM and CSR₂ with V-1 and S-36 than NB4D2. The results on silk productivity also showed relatively more increase in CSR₂ with V-1 and S-36 than NB4D2. A significant increase in silk productivity was also observed in PM with S-36

and V-1. But, the levels of productivity attained in PM were far less in view of the limitations of the race for silk protein biosynthesis.

Tazima (1978) observed that genome multiplication through polyploidy in the posterior silk gland is limited to 29 times in multivoltine races with DNA content of $107\mu\text{g}/\text{cell}$. In contrast, genome multiplication occurs 30 times in the posterior silk gland of bivoltine races with a DNA content of $214\mu\text{g}/\text{cell}$. The enzyme profiles of intermediary metabolism also complement the rates of silk protein biosynthesis in the races of the bivoltine groups. Gokulamma (2005) observed relatively greater activity levels of transaminases in the haemolymph and somatic tissues in CSR₅ than NB₄D₂ and PM. Transaminase activity generates more quantity of non essential amino acids like glycine, serine, alanine and acidic amino acids like glutamic acid, which together represent about 90% of the amino acids in the two silk proteins namely fibroin and sericin (Fukuda, 1960).

The filament length in all the races was in the order V-1 > S-36 > M-5. Among the races, PM and CSR₂ showed relatively higher increase in filament length than NB₄D₂. The longer filament length in all the races on V-1 and S-36 is associated with higher average filament size. The average filament size of the filament spun by all races was the least with M-5 followed by S-36 and V-1. Among the races, the average filament size of the bave was in the order of NB₄D₂ > CSR₂ > PM. Higher filament length with less average filament size contributes to less size deviation which enhances the uniformity of raw silk and its utility in weft. Halliyal *et al.*, (1988) and Naseema Begum *et al.*, (2004) observed that size deviation is a racial character. The lesser size deviation increases the reelability percentage and raw silk recovery as long filament of fine denier will have less breaks in the reeling process. Less variation in filament size leads to better evenness (Mahadevapa *et al.*, 2000). The results showed that CSR₂ responds to improved mulberry nutrition by spinning hardier cocoon with longer silk filament without significant increase in the average filament size. Neatness trait is influenced both by mulberry nutrition and race. Among the races, neatness is better expressed in CSR₂ than in NB₄D₂ and PM. All the races showed significant variation in neatness values according to the nutritional quality of the three mulberry varieties.

The reelability percentage which is inversely related to the number of breaks in the reeling process is known to be a racial character, but in the present investigation it was observed that reelability percentage was significantly different in relation to the mulberry varieties used for nutrition (Table III) than in relation to the three races. The means of reelability percentage among the races were not statistically significant whereas they were highly significant among the mulberry varieties. Also, better nutrition through V-1 and S-36 significantly improves reelability percentage in bivoltine races more than in PM as can be observed by looking at the interactions between the races and varieties. Whereas reelability % depends on the quality of the core silk fibre, raw silk recovery represents the relative percentage in weight of the four factors contributing to the formation of cocoon. 1) the floss necessary for anchoring, 2) the core silk fibre, 3) the sericin used for binding the cocoon fiber and 4) the soft pelade layer which serves as a cushion to protect the soft outer layers of the pupa especially before sclerotization and melanization against lesions caused by rub against hard inner cocoon surface layer. The floss content was not taken into account as deflossed cocoons were used for evaluation. The sericin was partially lost during cooking and significant differences in percent loss in sericin among the three races cannot be expected. The solubility of sericin at higher temperatures during cooking depends on exposure of hydrophilic side groups of acidic amino acids in the primary structure of outer sericin layer i.e., sericin I which constitutes 40% of the total sericin content (Rue, 1998). The raw silk recovery was in the order CSR₂ > PM > NB₄D₂ among the races and among varieties V-1 $\geq$ S36 > M-5. When interactions were considered, NB₄D₂ showed significant improvement in the raw silk recovery of 41.99% with V-1 and 40.68% with S-36 over M-5. NB₄D₂ utilizes nitrogen and energy resources more for biomass production under nutritional stress conditions and only the remaining nitrogen and carbon energy is utilized for cocoon production.

CSR₂, on the other hand, when fed with highly nutritious leaf showed an improvement of 10.37% and 9.41% only in raw silk recovery % with V-1 and S-36 respectively. The significant difference in

raw silk recovery percentage in the two bivoltine races in response to the mulberry nutrition could be attributed to the difference in the rationalization of energy resources under nutritional stress conditions. NB4D2 fed on a relatively poor nutritious leaf of M-5 spares more energy and nitrogen resources to egg production and pupal development by significantly reducing silk biosynthesis and hence raw silk recovery is very low in NB4D2 fed with M-5. Silk biosynthesis and cocoon production are not constrained much in CSR2 fed on M-5 leaf, but pupal development and egg production are crippled by the paucity of nitrogen and energy resources. Hence, pupae are weak and mortality is high in CSR2 reared on poor nutritive resources. Firdose Ahmad and Srinivasa Reddy (2006) reported relatively lower pupation percentage and fecundity in CSR2 than NB4D2 fed on M-5 leaf. Rendita which is the quantity of cocoons (Kg) to produce 1 kg of silk is dependent more on silkworm race though mulberry nutrition also influences the performance of the race (Table-III). Among the races, NB4D2 responds more significantly to mulberry nutrition than CSR2 and PM with respect to rendita.

Thus, it could be summarized that tropical multivoltine and bivoltine races like PM and NB4D2 have the ability to utilize the available nitrogen and carbon (energy) resources even under nutrition stress conditions towards biomass production and this tendency is responsible for the temperature tolerance observed in the races. A significant improvement in cocoon production was observed with improved nutrition. The relatively more active silk gland of CSR2 utilizes the nitrogen and energy resources even under nutrition stress conditions for its normal silk biosynthesis and secretory activities leaving little biomass for pupal development which therefore becomes weak and unviable. Normal pupal development was observed only when CSR2 was fed with nutritious leaf of high moisture content of S-36 or V-1 *ad libitum*. A bivoltine hybrid having desired traits of cocoon production like CSR2 and pupal biomass like NB4D2 is therefore most suitable for rearing in tropical Indian climates characterized by high ambient temperatures and poor quality of mulberry leaf.

REFERENCES

- DANDIN, S.B. JAYANT JAYASWAL & K. GIRIDHAR (2003) Handbook of Sericulture Technologies. Central Silk Board, Bangalore, p. 287.
- DATTA, R.K. (1992) Guidelines for Bivoltine rearing. Central Silk Board, Bangalore, India, p.18.
- FIRDOSE AHMAD MALIK & Y. SRINIVASA REDDY (2006) Influence of mulberry nutrition on manifestation of economic traits of selected races of the silkworm, *Bombyx mori* L. Int. J. Indust. Entomol. (press)
- FUKUDA T. (1960) The correlation between the mulberry leaves taken by the silkworm, the silk protein in the silk gland and silk filament. Bull. Ser. Exp. Sta. 15, 605-610.
- GOKULAMMA K. (2006) Evaluation of selected indigenous and productive races of *Bombyx mori* L. on the basis of environmental and nutritional parameters. Ph.D. Thesis University of Mysore. Mysore.pp.52-82.
- HALLIYAL, V.G., R. BANDIWAD, V.V. HADIMANI & S.B. DANDIN (1998) Influence of raw material characteristics and processes on raw silk yarn and fabric quality. In Silkworm Breeding. Ed. G. Sreerama Reddy, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt Ltd., New Delhi, pp. 337-345.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSENBOUGH, A.L. FARR & R.F. RANDALL (1951) Protein measurement with folinphenol reagent. J.Biol. Chem. 193, 265-275.
- MAHADEVAPA, D., V.G. HALIYAL, D.C. SHANKAR & RAVINDRA BHANDIWAD (2000) Productive bivoltine silkworm hybrid of *Bombyx mori* L. for longer filament length and thin denier. In: National Conference on Strategies for Sericulture Research and Development, Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore, India, 16-18, November 2000, P.27.
- MOORE, S. & W.H. STEIN (1968) A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. Biol. Chem., 211, 907-913.
- MIYASHITA, Y (1986) A report on mulberry cultivation and training methods suitable to bivoltine rearing in Karnataka. pp. 1-7.

- NASEEMA BEGUM, A., H.K. BASAVARAJA, A.K. PALIT, G.N. RAMASWAMY, M.MAL REDDY, N. SURESH KUMAR & G.V. KALPANA (2004) Studies on the characteristics of cocoons in different breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 44, 497-512.
- RUIEH, H. (1998) Silk Reeling Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, p.461
- SANNAPPA, B., RANAKRISHNA NAIKA, J. SHANTHALA & R. GOVINDAN (2005) Identification of mulberry genotypes suitable for cocoon characters of silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Current Sciences*, 7, 197-201.
- STEEL, J.E., G.E. MCDUGAL & R. SHADWICK (1988) Trehalose efflux from cockroach fat body *in vivo*. Paradoxical effects of the corpus cardiacum and methyl xanthines. *Insect Biochem.*, 18: 585-590
- TAZIMA, Y. (1978) The silkworm: An important laboratory tool. Kodansha Ltd., Tokyo, Japan.
- THIAGARAJAN, V., S. MASILAMANI, M.M. AHSAN & R.K. DATTA (1994) Stability analysis of economic traits in silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Genet. Breed.* 48, 345-352.
- TAKABAYASHI, C., KINOSHITA, H., TSUBOCHI, K., TSUBOI, H., WATANABE, T., SHIMIZU, S., HARIRAJ, G., NAIK, S.V. & MAHESH K.N. (1997) Manual on bivoltine silk reeling, Central Silk Board, Bangalore, p.85.
- TUKEY J.W. (1953) The problem of multiple comparison. Mimeographed for limited circulation (Reference from Snedecor, G.W., Statistical Methods. Iowa state college press, Ames).

ROLE DE LA NUTRITION SUR LA MANIFESTATION DES CARACTERES POST-COCON CHEZ DES RACES SELECTIONNEES DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

FIRDOSE AHMAD MALIK & Y. SRINIVASA REDDY*

Department of Studies in Sericultural Science, University of Mysore, Manasagangotri,
Mysore - 570 006, Inde.

La manifestation des caractères du cocon et post cocon dépend à la fois de la race de ver à soie et de la nutrition avec le mûrier. Il existe beaucoup de documents sur les différences d'expression des caractères quantitatifs. On n'a pas étudié le rôle de la nutrition avec le mûrier sur l'expression des caractères quantitatifs comme les caractères post-cocons. Il est nécessaire d'avoir des informations sur l'expression des caractères quantitatifs puisque la qualité de la soie grège dépend en grande partie des caractères métriques du cœur du filament. Dans cette étude, on nourrit trois races de vers à soie, PM, NB4D2 et CSR2, qui sont considérablement différentes en ce qui concerne les caractères du cocon et post cocon avec les feuilles de trois variétés de mûrier à savoir V-1, S-36 et M-5 pour évaluer le rôle de la nutrition sur l'expression des caractères post-cocon. Nous avons étudié l'influence de l'eau et des nutriments dans la feuille (qui sont considérablement différents chez les trois variétés de mûrier) sur la production de cocons et de biomasse et sur l'expression des caractères post-cocons.

INTRODUCTION

Le ver à soie du mûrier est monophage et tire l'eau et ses nutriments de la feuille de mûrier non seulement pour sa croissance et son développement mais aussi pour la production de cocons. Miyashita (1986) a observé que la qualité de la feuille seule contribue pour environ 38,2 % au succès de la récolte de cocons. On a abondamment étudié le rôle de la nutrition avec le mûrier sur le rendement en cocons (Sannappa et coll., 2005) mais les recherches étaient limitées aux écarts de rendement générés par la culture des variétés de mûrier dans différentes conditions agroclimatiques (Datta, 1992).

On n'a pas évalué l'influence de la nutrition avec le mûrier sur les caractères qualitatifs de la soie grège. Les caractères qualitatifs de la soie grège jouent un rôle important sur les exportations de soie grège puisque la soie grège exportable doit répondre à des normes de qualité élevées. Un certain nombre de nouvelles races ont été mises au point grâce à des techniques de lignage conventionnelles qui mettent l'accent de la sélection sur les caractères désirés puisque les caractères qualitatifs et quantitatifs sont considérés comme des caractères raciaux. Par ailleurs, la race de ver à soie, la qualité de la feuille et l'environnement influencent considérablement le rendement et la qualité de la soie grège (Naseema Begum et coll., 2004). On a étudié le rôle de l'environnement par rapport à la quantité et à la qualité de la soie produite d'après la performance saisonnière des différentes races de vers à

* Auteur auquel adresser la correspondance: Prof. Y. Srinivasa Reddy, DOS in Sericulture science, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore - 570 006, Tel: 0091-9448293656; Fax: 0091821-2419335. E-mail: yrs_yre@yahoo.com

soie (Thiagarajan, 1994) mais on n'a pas systématiquement étudié le rôle de la qualité de la feuille sur la production de cocons et sur les caractéristiques post-cocons.

Dans cette étude, on utilise les feuilles des variétés de mûrier, V-1, S-36 et M-5 pour l'élevage des trois races de vers à soie, c'est à dire PM, NB4D2 et CSR2. Les feuilles de V-1 sont connues pour leur valeur nutritive et leur capacité de rétention de l'eau élevées. Les feuilles de S-36 sont connues pour leur saveur et pour leur teneur élevée en eau tandis que les feuilles de la variété M-5 sont relativement pauvres à la fois en ce qui concerne leur valeur nutritive et leur teneur en eau. Parmi les races de vers à soie, CSR2 est un bivoltin très productif avec plus de 20 % de richesse soyeuse tandis que NB4D2 est un bivoltin moins productif et PM est la moins productive mais elle survit sur de la feuille de très mauvaise qualité. On nourrit les trois races sélectionnées pour leurs différences significatives de productivité et pour leurs caractères de survie sur des feuilles à la teneur nutritive et en eau variables, afin d'obtenir des informations sur le rôle de la nutrition avec du mûrier sur la manifestation des caractères post-cocons chez des races de vers à soie populaires représentant trois niveaux de performance de base, c'est à dire mauvaise, moyenne et bonne.

MATERIELS ET METHODES

On a planté les génotypes de mûrier M-5, S36 et V-1 dans la muraie du Département de Sériciculture de l'Université de Mysore, de Mansagangotri, à Mysore en 1998. Les parcelles mesurent 5 × 4 mètres avec un espace de plantation de 0,9 × 0,9 mètres. Le pH du sol sablonneux rouge riche en terreau utilisé pour la plantation est de 6,9. On conçoit l'expérience en blocs aléatoires avec trois répétitions. On applique les doses recommandées de fumier de ferme (FYM) de 20 MT / ha / an pour la plantation de S-36 et de M-5 et 40 MT pour la plantation de V-1 en deux doses séparées et les engrais chimiques au taux de 300 : 120 : 120 kg de NPK pour la plantation de S-36 et M-5 et de 350 : 140 : 140 kg de NPK pour la plantation V-1. On applique les engrais chimiques en cinq doses égales séparées pour l'azote et en deux pour le phosphore et le potassium, appliquées pendant les 1^{ère} et 3^{ème} récoltes. On apporte 1 136,25 m³ d'eau par demi-hectare tous les dix jours sur une période de récolte d'à peu près 70 jours pour les parcelles des trois variétés de mûrier.

Composition biochimique de la feuille :

On estime les constituants biochimiques de la feuille de mûrier comme la teneur en eau, les acides aminés libres totaux, les protéines totales et les substances positives totales d'anthrone (TAPS) chez les feuilles tendres, moyennes et épaisses d'échantillons secs de toutes les variétés de mûrier.

Humidité de la feuille :

On calcule la teneur en eau de la feuille d'après la formule suivante et on l'exprime en termes de pourcentage,

$$\% \text{ d'eau de la feuille} = \frac{\text{Poids frais de la feuille (g)} - \text{poids sec de la feuille (g)}}{\text{Poids frais de la feuille (g)}} \times 100$$

Estimation des acides aminés libres totaux :

On estime la teneur totale en acides aminés libres en suivant la méthode de Moore et Stein (1968) en utilisant la tyrosine comme étalon. On exprime la teneur totale en acides aminés libres en mg d'acide aminé libre / g de poids sec de l'échantillon de feuille.

Estimation des protéines totales :

On estime la teneur en protéines de la feuille par la méthode de Lowry et coll., (1951) en utilisant de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme étalon et on exprime les valeurs en termes de mg de protéine / g de poids sec d'échantillon de feuille.

Substances positives totales à l'anthrone (TAPS) :

On estime les substances positives totales à l'anthrone (TAPS) de la feuille de mûrier en suivant la méthode de Steel et coll., (1988) en utilisant le glucose comme étalon. On exprime les substances positives totales à l'anthrone en mg de TAPS / g de poids sec de l'échantillon de la feuille.

Elevage du ver à soie :

On lève et on élève séparément des pontes saines (DFL) des trois lignées de vers à soie sélectionnées, c'est à dire PM, NB4D2 et CSR2 d'après la technique d'élevage habituelle de Dandin et coll., (2003) sur des feuilles fraîches des variétés de mûrier V-1, S-36 et M-5. On réalise l'expérience pendant l'été (mars-avril) quand la température ambiante est de 30 à 35° C. Au début du 3^{ème} âge, on ne retient que 300 larves de chaque répétition pour l'élevage ultérieur. A la fin de l'élevage, on enregistre le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse et la productivité de la soie. La productivité de la soie est la quantité de soie synthétisée en tant que fonction de la durée larvaire, en jours de développement du 5^{ème} âge. Seule la soie synthétisée pendant le développement du 5^{ème} âge larvaire est utilisée pour l'activité de filage et la production de bave. Il est important de la considérer comme un caractère économique parce que la quantité de soie synthétisée ainsi que la durée de la synthèse de la soie sont des paramètres importants à considérer pour déterminer le potentiel productif d'une race. Les deux paramètres diffèrent considérablement chez les différentes races et on utilise la productivité de la soie, qui découle des deux, comme un caractère économique pour considérer la performance comparative des trois races sélectionnées.

Processus de dévidage :

On sélectionne cinquante cocons dévidables (provenant de trois répétitions) de PM, NB4D2 et CSR2 élevés séparément sur les variétés de mûrier V-1, S-36 et M-5 et on les dévide selon la technique habituelle (Takabayashi et coll., 1997). On sèche les cocons dans un four à air chaud pendant une période de 5 heures avec un profil de température de :

100° C (1 heure)→90° C (1 heure)→80° C (1 heure)→70° C (1 heure)→ 60° C (1 heure)

Puis on stocke les cocons à température ambiante pendant 48 heures. On procède à la cuisson des cocons avec le système de cuisson dans trois bassines.

Première bassine : 45° C - 60 secondes

Deuxième bassine : 65 ° C - 120 secondes

Troisième bassine : 95° C - 60 secondes

On refroidit les cocons et on les amène à une température de dévidage de 40° C en vaporisant de l'eau froide. On dévide les cocons en utilisant une bassine avec une circonférence d'un mètre. La vitesse de dévidage est de 120 à 150 mètres / min. Après l'achèvement du dévidage, on enregistre la longueur totale du filament. On sèche la soie dévidée dans un four à air chaud, à une température de 70° C pendant 24 heures. Puis, on transfère le filament de soie dans des dessiccateurs pour l'absorption ultérieure de l'humidité, avant l'enregistrement du poids de la soie.

On calcule la longueur du filament, la rentrée de soie grège, le titre du filament, la dévidabilité, la netteté et le rendement à la bassine à la fin du processus de dévidage en suivant les formules :

$$1) \text{ Longueur du filament (m)} = \frac{\text{Longueur totale du filament}}{1 + \text{nombre de ruptures}}$$

$$2) \text{ Denier} = \frac{\text{Poids conditionné de la soie grège}}{\text{Longueur totale de la soie grège}} \times 9000$$

$$3) \text{ Dévidabilité (\%)} = \frac{\text{Nombre de cocons de dévidage}}{\text{Nombre de jetés de bouts}} \times 100$$

$$4) \% \text{ de rentrée de soie grège} = \frac{\text{Poids de la soie}}{\text{Poids de la coque}} \times 100$$

5) Pourcentage de soie grège =

$$\frac{\text{Poids de la soie grège dévidée} + \text{poids de la soie convertie des cocons bassinés}}{\text{Poids des cocons pris pour le dévidage}} \times 100$$

$$6) \text{ Rendement à la bassine} = \frac{\text{Poids des cocons (kg)}}{\text{Poids de la soie grège dévidée (kg)}} \times 100$$

7) Netteté :

On enroule la soie sur 10 panneaux et on classe les points de netteté en les comparant avec les valeurs standard.

Analyse statistique :

On utilise l'analyse de variance à deux facteurs pour tester la signification des différences de moyennes pour les caractères économiques, chez les races de vers à soie élevées sur les différentes variétés de mûrier. On utilise les tests de comparaison multiples de Tukeys (1953) pour évaluer la signification de la différence de moyennes entre les races de vers à soie et les variétés de mûrier. On considère les différences significatives au seuil de $P < 0,05$.

RESULTATS

Composition biochimique des feuilles des variétés de mûrier :

Les résultats sur la composition biochimique de la feuille de mûrier comme la teneur en eau de la feuille de mûrier, la totalité des acides aminés libres, les protéines totales et les substances positives totales à l'antrone (TAPS) sont présentés dans le Tableau I.

Humidité de la feuille :

Le niveau moyen en eau des feuilles tendres, moyennes et épaisses (Tableau I) est relativement plus important chez la variété V-1 (76,20 %) suivie par S-36 (74,54 %) et M-5 (72,47 %). Chez les trois variétés, la teneur en eau de la feuille est plus importante chez les feuilles tendres (76,57 %) que chez les feuilles moyennes (74,20 %) et les feuilles épaisses (72,44 %). L'interaction montre que la feuille tendre de V-1 a la teneur en eau la plus élevée (78,08 %) et la feuille épaisse de M-5 a la teneur en eau la moins importante (70,29 %).

Acides aminés libres totaux :

Les niveaux d'acides aminés libres moyens, pour tous les niveaux de maturité de la feuille, sont plus élevés chez V-1 (13,03 mg / g) suivie par S-36 (11,87 mg / g) et M-5 (9,93 mg / g). Les niveaux d'acides aminés libres moyens, chez les trois variétés sont relativement élevés chez la feuille moyenne (13,53 mg / g), suivie par les feuilles épaisses (12,59 mg / g) et les feuilles tendres (8,72 mg / g). On observe donc le niveau le plus élevé en acides aminés dans les feuilles moyennes de la variété V-1 (14,59 mg / g) et le moins important dans les feuilles tendres de la variété M-5 (8,09 mg / g).

Protéines totales :

Les niveaux moyens en protéines totales sont relativement plus élevés chez V-1 (233,2 mg / g) que chez S-36 (225,5 mg / g) et M-5 (200,4 mg / g). Le niveau de protéines totales moyen est relativement plus élevé chez la feuille tendre (241,57 mg / g), suivie par la feuille moyenne (217,3 mg / g) et la feuille épaisse (200,35 mg / g). Chez les feuilles avec différents niveaux de maturité, la feuille tendre de V-1 a le niveau le plus élevé en protéines (252,6 mg / g) tandis que les feuilles épaisses de M-5 ont le niveau le moins important en protéines (183,6 mg / g).

Substances totales positives à l'anthrone (TAPS) :

Les niveaux moyens des TAPS sont relativement plus élevés chez V-1 (82,90 mg / g), suivie par S-36 (80,69 mg / g) et M5 (75,01 mg / g). Quant aux différents niveaux de maturité, la feuille épaisse a des niveaux relativement plus élevés en TAPS (86,33 mg / g), suivie par les feuilles moyennes (80,66 mg / g) et tendres (71,62 mg / g). La feuille épaisse de V-1 a le niveau le plus élevé en TAPS (90,94 mg / g) tandis que la feuille tendre de M-5 a les niveaux les moins importants en TAPS (68,72 mg / g).

Caractères économiques :

Les résultats concernant les caractères économiques des races de vers à soie, élevées sur différentes variétés de mûrier, sont présentés dans les Tableaux II à III.

Poids du cocon :

Le poids moyen du cocon de toutes les races est le plus élevé chez les lots de larves élevées avec la variété V-1 (1,524 g), suivie par S-36 (1,457 g) et M-5 (1,316 g). Parmi les trois races, NB4D2 présente le poids moyen du cocon le plus élevé (1,647 g) suivi par CSR2 (1,617 g) et PM (1,033 g). On remarque une augmentation importante du poids du cocon chez NB4D2 sur V-1 (1,824 g), suivie par S-36 (1,658 g) et M-5 (1,460 g) et chez CSR2 sur V-1 (1,684 g), suivie par S-36 (1,650 g) et M5 (1,518 g). Chez PM, le poids du cocon observé sur V-1 (1,065 g) et sur S-36 (1,064g) est significativement plus élevé que sur M5 (0,970 g).

Poids de la coque :

Le poids moyen de la coque de toutes les races est relativement plus élevé sur V-1 (0,304 g), suivie par S-36 (0,267 g) et M-5 (0,216 g). CSR₂ présente un poids moyen de coque relativement plus élevé (0,347 g) que NB4D2 (0,302 g) et PM (0,137 g). On observe une augmentation considérable du poids de la coque chez CSR2 sur V-1 (0,401 g) par comparaison à S-36 (0,348 g) et M-5 (0,294 g) et chez NB4D2 (0,355 g) sur V1, suivie par S-36 (0,309 g) et M-5 (0,242 g). Chez PM aussi, on observe un poids de coque plus élevé sur V-1 (0,155g) que chez S-36 (0,144 g) et M-5 (0,113 g).

Richesse soyeuse :

La richesse soyeuse moyenne de toutes les races est relativement plus élevée sur V-1 (19,29 %), suivie par S-36 (17,87 %) et M-5 (15,86 %). CSR₂ présente une richesse soyeuse relativement plus élevée (21,54 %), suivie par NB4D2 (18,22 %) et M5 (13,26 %). On observe une augmentation importante de la richesse soyeuse chez CSR2 sur V-1 (23,83 %), suivie par S36 (21,39 %) et M-5 (19,40 %). NB4D2 présente une richesse soyeuse relativement plus élevée sur V-1 (19,50 %) et S-36 (18,65 %) plus que sur M-5 (16,53 %). PM présente aussi une richesse soyeuse plus élevée sur V-1 (14,55 %) et sur S-36 (13,58 %), plus que sur M-5 (11,66 %).

Productivité en soie :

La productivité moyenne en soie de toutes les races est plus importante sur V-1 (4,790 cg / jour) que sur S-36 (4,291 cg / jour) et sur M-5 (2,884 cg / jour). CSR₂ présente une productivité moyenne en soie relativement plus élevée (5,302 cg / jour), plus que NB4D2 (4,715 cg / jour) et PM (1,947 cg

/jour). On remarque une augmentation relativement plus élevée de la productivité chez CSR₂ sur V-1 (6,463 cg / jour) que sur S-36 (5,726 cg / jour) et sur M-5 (3,716 cg / jour). NB4D₂ présente une productivité relativement plus élevée sur V-1 (5,720 cg / jour) que sur S-36 (4,993 cg / jour) et sur M-5 (3,433 cg / jour). Chez le polyvoltin PM, on observe une productivité en soie significativement plus élevée sur V-1 (2,186 cg / jour) que sur S-36 (2,153 cg / jour) et sur M-5 (1,503 cg / jour).

Longueur du filament :

La longueur moyenne du filament de toutes les races est relativement plus importante sur V-1 (929 m), que sur S-36 (904 m) et M-5 (806 m). On observe la longueur moyenne du filament la plus élevée chez CSR₂ (1077 m), suivie par NB4D₂ (1020 m) et PM (542 m). On observe une augmentation significative de la longueur du filament chez CSR₂ sur V-1 (1135 m), suivie par S-36 (1111 m) et par M-5 (984 m). NB4D₂ présente une longueur de filament relativement plus élevée sur V-1 (1061 m) et sur S-36 (1035 m) que sur M-5 (965 m). PM présente aussi une longueur de filament plus élevée sur V-1 (591 m) que sur S-36 (566 m) et sur M-5 (469 m).

Titre du filament :

Chez toutes les races, le titre moyen du filament est relativement plus élevé sur V-1 (2,81) que sur S-36 (2,64) et sur M-5 (2,32). Parmi les races de ver à soie, NB4D₂ présente un titre moyen de filament relativement plus élevé (2,95), que CSR₂ (2,62) et PM (2,21). On observe une augmentation significative du titre du filament chez NB4D₂ sur V-1 (3,06), comparée à S-36 (2,97) et à M-5 (2,82). CSR₂ présente un titre de filament plus élevé sur V-1 (2,89) et S-36 (2,86), que sur M-5 (2,10). PM présente aussi un titre de filament plus élevé sur V-1 (2,48) et S-36 que sur M-5 (2,04).

Dévidabilité :

Chez toutes les races, le % moyen de dévidabilité est relativement plus élevé sur V-1 (85,00) que sur S-36 (80,55) et sur M-5 (65,88). Il n'y a pas de différence significative concernant la dévidabilité moyenne de CSR₂ (77,44), de NB4D₂ (77,44) et de PM (76,55). On observe une augmentation significative de la dévidabilité chez CSR₂ sur V-1 (87), comparée à S-36 (82,00) et à M5 (63,33). NB4D₂ présente une dévidabilité relativement plus élevée sur V-1 (85,00) et sur S-36 (83,00) que sur M-5 (64,33). PM présente aussi une dévidabilité plus élevée sur V-1 (83,00) et sur S-36 (76,66) que sur M-5 (70,00).

Pourcentage de soie grège :

Les pourcentages moyens de soie grège sont relativement plus élevés sur V-1 (14,10), que sur S-36 (13,54) et M-5 (11,84). Parmi les races de vers à soie, CSR₂ présente le pourcentage de soie grège le plus élevé (16,91), suivie par NB4D₂ (13,26) et PM (9,31). On observe une augmentation significative du pourcentage de soie grège chez CSR₂ sur V-1 (17,80) et sur S-36 (17,33) par rapport à M-5 (15,60). NB4D₂ présente un pourcentage de soie grège relativement plus élevé sur V-1 (14,80) et sur S-36 (13,80) que sur M-5 (11,20). PM présente aussi un pourcentage de soie grège plus élevé sur V-1 (9,70) et sur S-36 (9,50) que sur M-5 (8,73).

Rentrée de soie grège :

Il n'y a pas de différence significative concernant la rentrée moyenne de soie grège entre V-1 (78,83 %) et S-36 (78,44 %), tandis que la rentrée de soie grège est significativement moins importante avec M-5 (65,70 %). Parmi les races de vers à soie, CSR₂ présente la rentrée de soie grège la plus élevée (78,80 %), suivie par NB4D₂ (72,77 %) et par PM (71,38 %). On observe une augmentation significative de la rentrée de la soie grège chez CSR₂ sur V-1 (81,60 %) et sur S-36 (80,89 %), comparée à M-5 (73,93 %). NB4D₂ présente une rentrée de soie grège relativement plus élevée sur V-1 (79,46 %) et sur S-36 (78,73 %) que sur M-5 (67,20 %). PM présente aussi une rentrée de soie grège plus élevée sur S-36 (75,70 %) et sur V-1 (75,43 %), que sur M-5 (55,96 %).

Netteté :

Chez toutes les races, la netteté moyenne est relativement plus importante sur V-1 (91,6) suivie par S-36 (89,6) et M-5 (86,6). Parmi les races, on observe la netteté moyenne la plus élevée chez CSR₂ (92,0), suivie par NB4D₂ (89,3) et PM (86,6). On observe une augmentation significative de la netteté chez CSR₂ sur V-1 (94,00) par rapport à S-36 (92,0) et M-5 (90,0). NB4D₂ présente une netteté relativement plus élevée sur V-1 (92,00) et sur S-36 (90,00), que sur M-5 (86,0). PM présente aussi la netteté la plus élevée sur V-1 (89,0), suivie par S-36 (87,0) et M-5 (84,0).

Rendement à la bassine :

Chez toutes les races, le rendement moyen à la bassine s'avère considérablement plus élevé sur M-5 (9,04 kg), suivie par S-36 (8,25 kg) et par V-1 (7,61 kg). Parmi les races de ver à soie, PM présente un rendement moyen à la bassine relativement plus élevé (10,9 kg) suivi par NB4D₂ (8,03 kg) et CSR₂ (5,92 kg). On observe une augmentation significative du rendement à la bassine chez PM sur M-5 (11,5 kg) comparée à S-36 (10,7 kg) et à V-1 (10,5 kg). NB4D₂ présente un rendement à la bassine relativement plus élevé sur M-5 (9,20 kg) et sur S-36 (8,10 kg) que sur V-1 (6,80 kg). CSR₂ présente aussi un rendement à la bassine plus élevé sur M-5 (6,40 kg) que sur S-36 (5,89 kg) et sur V-1 (5,46 kg).

DISCUSSION

Les feuilles des trois variétés de mûrier présentent une variation significative de leur composition biochimique, en ce qui concerne les nutriments principaux comme les acides aminés libres totaux, les protéines totales, les substances positives à l'anthrone (TAPS) et la teneur en eau de la feuille. La composition biochimique varie aussi avec les niveaux de maturité de la feuille. Quand on prend en considération les moyennes des trois niveaux de maturité, l'eau de la feuille et les constituants biochimiques étudiés, sont relativement plus élevés chez V-1 suivie par S-36 et M-5 (Tableau I). Chez les trois variétés de mûrier, à différents niveaux de maturité, une relation inverse entre les acides aminés libres et les protéines totales est apparente d'une part et entre les TAPs et les protéines totales d'autre part. Par exemple, la feuille tendre présente des niveaux moyens en protéines plus élevés (241,5 mg / g) et des niveaux en acides aminés (8,72 mg / g) et en TAPS (71,60 mg / g) inférieurs, tandis que la feuille épaisse présente un niveau en protéines inférieur (200,3 mg) et plus élevé en TAPS (86,3 mg / g).

Les niveaux en acides aminés libres fournissent la matière première pour la biosynthèse des protéines, en utilisant l'énergie fournie par les TAPS qui servent de réserve d'énergie principale. La composition biochimique de la feuille montre clairement la supériorité des feuilles des variétés V-1 et S-36 par rapport à M-5. Les feuilles de V-1 et de S-36 présentent une biomasse de respectivement 5,60 et 5,18 g / feuille tandis que la feuille de M-5 présente une biomasse de 4,0 g / feuille. Pour les trois variétés de mûrier, on observe aussi une variation significative du rendement en feuilles dans du sol sablonneux rouge riche en terreau, recevant la dose recommandée d'engrais et d'eau. Le rendement foliaire moyen est de 60 t / ha / an et de 40 t / ha / an chez respectivement V-1 et S-36 tandis qu'il est de 35 t / ha / année dans le cas de M-5. Avec un rendement aussi élevé et une teneur aussi élevée en eau, les feuilles de V-1 et de S-36 utilisent l'azote du sol et l'eau du sol à un rythme plus rapide et on recommande donc des doses plus élevées à la fois de fumier de ferme et d'engrais chimiques et une meilleure irrigation pour maintenir les niveaux de rendement des plantations de mûrier de V-1 et de S-36. Les études réalisées jusqu'à présent étaient limitées à l'obtention de niveaux de rendement plus élevés avec les variétés de mûrier supérieures mais non pas à des études systématiques sur l'impact de la nutrition avec le mûrier sur la productivité du cocon et les caractères postcocon.

La production de cocons et les caractères post-cocon sont considérablement influencés par la nutrition avec le mûrier. Chez toutes les races, les poids moyens du cocon sont considérablement plus élevés avec la variété de mûrier V-1 qu'avec S-36 et M-5 (Tableau II). Chez NB4D₂, le poids du

cocon est considérablement différent avec les trois variétés et se classe dans l'ordre suivant V-1 > S-36 > M-5. Pour PM (connue pour sa faible productivité), la différence de poids du cocon obtenue avec V-1 et avec S-36 n'est pas significative, bien que considérablement plus élevée que le poids du cocon avec M-5. De même, chez CSR2, les niveaux moyens pour le poids du cocon ne présentent pas de différence significative entre V-1 et S-36 mais sont considérablement plus élevés que sur M-5.

Chez NB4D2, l'augmentation du poids du cocon avec V-1 et S-36 se répercute par des augmentations significatives à la fois du poids nymphal et du poids de la coque tandis que dans le cas de PM et de CSR2, on observe une augmentation relativement plus importante de poids de la coque que du poids nymphal (Tableau II). Chez NB4D2, la nutrition avec le mûrier est utilisée à la fois pour la croissance somatique et de la glande séricigène tandis que chez PM et CSR2, les feuilles nutritives de V-1 et de S-36 sont plus utilisées pour la croissance de la glande séricigène que pour la croissance somatique. Gokulamma (2005) a observé une teneur plus élevée en protéines chez les feuilles tendres, moyennes et grossières de V-1 et de S-36 que chez M-5 pendant toutes les saisons de l'année. La teneur plus élevée en protéines chez V-1 et S-36 est utilisée chez les trois races pour la biosynthèse des protéines de soie, ce qui entraîne une augmentation significative du poids de la coque. Les résultats obtenus pour la richesse soyeuse, qui augmente relativement plus chez PM et CSR2 sur V-1 et S-36 que chez NB4D2 confirment cette observation. Les résultats obtenus pour la productivité de la soie sont plus élevés chez CSR2 avec V-1 et S-36 que chez NB4D2. On observe aussi une augmentation de la productivité de la soie chez PM avec S-36 et V-1. Mais, les niveaux de productivité atteints par PM sont beaucoup moins importants compte tenu des limitations à la biosynthèse des protéines de soie chez cette race.

Tazima (1978) a observé que la multiplication du génome par la polyploidie dans la glande séricigène postérieure est limitée à 29 fois chez les races polyvoltines avec une teneur en ADN de 107 µg / cellule. Par contre, la multiplication du génome se produit 30 fois dans la glande séricigène des races bivoltines, avec une teneur en ADN de 214 µg / cellule. Chez les races des groupes bivoltins, les profils enzymatiques du métabolisme intermédiaire complètent aussi les taux de biosynthèse des protéines. Gokulamma (2005) a observé des niveaux relativement plus importants d'activité des transminases dans l'hémolymphe et les tissus somatiques de CSR5 que dans ceux de NB4D2 et de PM. L'activité de transminase génère plus de quantité en acides aminés non essentiels comme la glycine, la sérine, l'alanine et en acides aminés acides comme l'acide glutamique, qui représentent ensemble environ 90 % des acides aminés chez les deux protéines de la soie, à savoir la fibroïne et la séricine (Fukuda, 1960).

Chez toutes les races, la longueur du filament se classe dans l'ordre V-1 > S-36 > M-5. PM et CSR2 présentent une augmentation relativement plus élevée de la longueur du filament que NB4D2. Chez toutes les races, la longueur plus importante du filament sur V-1 et sur S-36 est associée à un titre moyen de filament plus élevé. Le titre moyen du filament filé par toutes les races est le moins important avec M-5, suivie par S-36 et V-1. Le titre moyen du filament de la bave se classe dans l'ordre suivant NB4D2 > CSR2 > PM. Un filament plus long avec un titre moyen moins important contribue à une meilleure régularité du titre, qui améliore l'uniformité de la soie grège et est utile pour la trame. Halliyal et coll., (1988) et Naseema Begum et coll., (2004) ont observé que la régularité du titre est un caractère génétique. Plus la régularité du titre est grande, plus cela augmente le pourcentage de dévidabilité et la rentrée de soie grège, puisqu'un long filament au titre fin subira moins de ruptures pendant le processus de dévidage. Une variation moins importante du titre du filament entraîne une meilleure régularité (Mahadevapa et coll., 2000). Les résultats montrent que CSR2 répond à l'amélioration de la nutrition avec le mûrier en filant un cocon plus dur avec un filament de soie plus long, sans augmentation importante du titre moyen. Le caractère de la netteté est influencé à la fois par la nutrition avec le mûrier et par la race. Parmi les races, la netteté s'exprime mieux chez CSR2 que chez NB4D2 et PM. Toutes les races présentent une variation significative des valeurs de netteté en fonction de la supériorité nutritionnelle des trois variétés de mûrier.

Le pourcentage de dévidabilité qui est inversement lié au nombre de ruptures pendant le processus de dévidage est connu comme un caractère génétique, mais dans cette étude, on a observé que le % de dévidabilité est significativement différent en fonction des variétés de mûrier utilisées pour la nutrition (Tableau III) plus que lié aux trois races de ver à soie. Les moyennes pour le pourcentage de dévidabilité entre les races ne sont pas significatives sur le plan statistique, tandis qu'elle sont très significatives entre les variétés de mûrier. De même, la meilleure nutrition avec V-1 et S-36 améliore significativement le pourcentage de dévidabilité chez les races bivoltines, plus que chez PM comme on peut l'observer en étudiant les interactions entre les races et les variétés. Tandis que le pourcentage de dévidabilité dépend de la qualité du cœur de la fibre de soie, la récupération de soie grège représente le pourcentage relatif en poids de quatre facteurs qui contribuent à la formation du cocon 1) la bourre nécessaire à l'ancrage 2) le cœur de la fibre de soie, 3) la sérécine utilisée pour lier la fibre du cocon et 4) la couche satinée de pélette qui sert de coussin pour protéger les couches externes tendres de la nymphe, surtout avant la sclérotisation et la mélanisation, contre les lésions provoquées par le frottement contre la couche dure de la surface interne du cocon. On ne prend pas en compte la teneur en bourre puisqu'on utilise des cocons débourrés pour l'évaluation. La sérécine est partiellement perdue pendant la cuisson et on ne peut pas s'attendre à des différences importantes de pourcentage de perte en sérécine chez les trois races. La solubilité de la sérécine à des températures plus élevées pendant la cuisson, dépend de l'exposition des groupes hydrophylques secondaires dans la structure primaire de la couche externe de sérécine, c'est à dire la sérécine I qui représente 40 % de la teneur totale en sérécine (Rue, 1988). La rentrée de soie grège se classe dans l'ordre $CSR2 > PM > NB4D2$ entre les races et entre les variétés de mûrier dans l'ordre $V-1 \geq S36 \geq M5$. Quand on prend en compte les interactions, NB4D2 présente une amélioration significative de la rentrée de soie grège de 41,99 % avec V-1 et de 40,68 % avec S-36 par rapport à M-5. NB4D2 utilise les ressources en azote et en énergie plus pour la production de biomasse dans des conditions de stress nutritionnel et seuls l'azote et le carbone qui restent sont utilisés pour la production de cocons.

D'autre part, quand CSR2 est nourri avec une feuille très nutritive, elle ne présente une amélioration de la rentrée de soie grège que de 10,37 % et seulement de 9,41 % avec respectivement V-1 et S-36. On pourrait attribuer la différence significative concernant le pourcentage de rentrée de soie grège chez les deux races bivoltines, en réponse à la nutrition avec le mûrier, à la différence de rationalisation des ressources en énergie dans des conditions de stress nutritionnel. NB4D2, nourrie sur une feuille relativement peu nutritive de M5, dépense plus de ressources en énergie et en azote pour la production d'œufs et pour le développement nymphal, ce qui diminue considérablement la biosynthèse de la soie et donc la rentrée de soie grège est très faible chez NB4D2 nourri avec M-5. Quand on nourrit CSR2 sur de la feuille de M-5, cela ne gêne pas beaucoup la biosynthèse de la soie et la production de cocons mais le manque de ressources en azote et en énergie gênent le développement nymphal et la production d'œufs. Les nymphes sont donc faibles et la mortalité est élevée quand on élève CSR2 sur de mauvaises ressources nutritives. Firdose Ahmad et Srinivasa Reddy (2006) ont rapporté un pourcentage de nymphose et une fécondité relativement plus faibles chez CSR2 que chez NB4D2 quand on l'élève sur de la feuille de M-5. Le rendement à la bassine qui est la quantité de cocons (kg) pour produire 1 kg de soie dépend plus de la race de ver à soie, bien que la nutrition avec le mûrier influence aussi la performance de la race (Tableau III). Parmi les races, en ce qui concerne le rendement à la bassine, NB4D2 répond de manière plus significative que CSR2 et PM à la nutrition avec le mûrier.

On peut donc en déduire que les races tropicales polyvoltine et bivoltine comme PM et NB4D2 disposent de la capacité à utiliser les ressources en azote et en carbone (énergie) disponibles, même dans des conditions de stress nutritionnel, pour la production de biomasse et cette tendance est responsable de la tolérance de ces races à la température. On observe une amélioration importante de la production de cocons avec l'amélioration de la nutrition. La glande sérécigène relativement plus active de CSR2 utilise les ressources en azote et en énergie même dans des conditions de stress nutritionnel pour la biosynthèse et les activités sécrétrices normales de la soie, en laissant peu de

biomasse pour le développement nymphal, qui devient donc faible et non viable. On observe un développement nymphal que lorsque CSR₂ est nourri *ad libitum* avec de la feuille nutritive, à la teneur élevée en eau de S-36 ou de V-1. Un hybride bivoltin disposant des caractères désirés comme CSR₂ pour la production de cocons et comme NB4D2 pour la biomasse nymphale est donc plus adapté à l'élevage dans des climats tropicaux indiens, caractérisés par des températures ambiantes élevées et une feuille de mûrier de mauvaise qualité.

LEAF QUALITY OF MILDEW AFFECTED LEAVES AND THEIR EFFECT ON MORTALITY AND ECONOMIC CHARACTERS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

S. MANIMEGALAI & N. CHANDRAMOHAN

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

Leaf quality of mulberry is a major factor for higher productivity of quality cocoons which is deteriorated by many factors among which, diseases are most serious. The leaves affected by the fungus, *Phyllactinia corylea* showed reduction in leaf moisture (22.77 to 29.78 per cent) and chlorophyll. Feeding mulberry silkworm, *Bombyx mori* with leaves affected by fungus, *P. corylea* resulted in enhancement of the larval period by 27 hrs and 11 hrs respectively when fed to fourth and fifth instar worms. It also resulted in mortality of worms besides reducing the economic parameters such as larval weight, cocoon weight, shell weight and shell ratio. Significant reduction in yield parameters i. e., cocoon yield by number (4400, 9980) and cocoon yield by weight in kgs (6.70, 16.98) were obtained for 10,000 fourth instar worms when fed with affected and healthy leaves respectively. The cocoon yield by no. (5700, 9992) and cocoon yield by weight in kgs (9.23, 17.20) were recorded when the fifth instar worms were fed with diseased and healthy leaves respectively.

Keywords: *Bombyx mori*, powdery mildew fungus, *Phyllactinia corylea*, mortality, economic parameters.

INTRODUCTION

Mulberry leaf constitutes the sole food of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. It is a fast growing plant with leaves richer in protein, sugars and moisture. The leaf nutrient content is highly affected by a number of factors among which major role is played by diseases. Mulberry crop is affected by foliar diseases such as powdery mildew (*Phyllactinia corylea*) (Pers) Karst, leaf spot (*Cercospora moricola* (Cooke) and leaf rust, *Cerotelium fici* (Cast) Arth which affects the normal growth and yield of mulberry. Feeding of diseased leaves adversely affected the growth and health of silkworm resulting in partial or sometimes complete failure of cocoon crops and reduced the marketing quality of cocoons produced (Dandin, 2000). The adverse effect of leaves affected by leaf spot (Sikdar and Krishaswami, 1980) and rust (Umesh Kumar *et al.*, 1993) on cocoon yield were already reported.

Powdery mildew disease is very severe in Nilgiris district of Tamil nadu and B.R hills of Karnataka state during August and November months, where a thick cottony growth of fungus was observed on the under surface of leaves. However, this disease is also severe during November, December and January months in plains which needs attention. Hence, in the present study, an attempt was made to assess the leaf nutrient content of mildew affected leaves and their impact on mortality and economic parameters of *B. mori*.

MATERIALS AND METHODS

Effect of feeding mildew affected leaves:

Two laboratory experiments were carried out to study the effect of mildew diseased leaves on mortality and economic parameters of *B. mori*. In the first experiment, larvae out of third moult were fed with diseased leaves until fourth moult and in the second experiment, worms out of fourth moult were fed with diseased leaves until spinning. During the remaining period, larvae were fed with healthy leaves. The cross breed, PM × NB4D2 were used for the experiment and the rearing was carried out as per method by Krishnaswami *et al.* (1973). Each experiment consisted of two treatments replicated eight times @ 50 larvae/replication. Observations were made on fifth instar larval duration, larval mortality and economic parameters such as larval weight, cocoon weight and shell weight. The yield parameters such as cocoon yield by number and cocoon yield by weight were also recorded.

Leaf nutrient content:

The moisture and chlorophyll content in diseased and healthy leaves were estimated in the commercially exploited varieties such as V1, MR2, Kanva 2, S34 and DD. Chlorophyll a, b and total chlorophyll were estimated by spectrophotometry (Sadasivam and Manickam, 1996).

$$\text{Chlorophyll a (mg/g)} = \frac{12.7 (\text{OD } 663) - 2.69 (\text{OD } 645)}{1000} \times \frac{V}{W}$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/g)} = \frac{22.9 (\text{OD } 645) - 4.68 (\text{OD } 663)}{1000} \times \frac{V}{W}$$

$$\text{Total chlorophyll} = \frac{20.2 (\text{OD } 645) + 8.02 (\text{OD } 652)}{1000} \times \frac{V}{W}$$

V = Final volume of the extract in ml

W = weight of leaf sample taken for estimation.

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf nutrient content:

Moisture content:

Significant loss in leaf moisture was observed in the varieties V1 (22.77%), MR 2 (26.33%), Kanva 2 (26.99%), S34 (27.60%) and DD (29.78%) (Table I). Moisture content of leaves have a significant effect on palatability of the worms which in turn affected the growth of worms leading to yield reduction. Reduction in leaf moisture in fungus affected leaves was reported by Sundareswaran *et. al.* (1988).

Leaf chlorophyll:

Significant reduction in chlorophyll a, b and total chlorophyll content were observed in the mildew affected leaves of mulberry varieties, V 1, MR 2, Kanva 2, S 34 and DD. The total chlorophyll content in mg/g estimated respectively in mildew affected and healthy leaves of different varieties were V1 (0.38, 0.45), MR 2 (0.45, 0.53), Kanva 2 (0.41, 0.57), S 34 (2.60, 3.48) and DD (0.43, 0.53). Chlorophyll content have a significant role in the disease resistance mechanism as it is responsible for the production of red fluorescent protein with antiviral properties. Hayaskiya *et al.*, (1969) reported the role of chlorophyll in disease resistance. The role of caryophyllene in inhibiting the growth of microorganisms in insects was reported by Tanada and Kaya (1993). Manimegalai and Chandramohan (2005) reported that leaf quality constituted a major factor for the occurrence of flacherie after a survey conducted in major silkworm rearing districts of Tamil nadu. Significant changes in leaf moisture, chlorophyll, carotene and polyphenol in diseased leaves of mulberry was reported by Iyengar (1975).

Table I. Leaf moisture content in varieties affected by *Phyllactinia corylea* in mulberry.Tableau I. Teneur en eau de la feuille chez les variétés de mûrier atteintes par *Phyllactinia corylea*.

Varieties	Moisture content (%) Teneur en eau (%)		
	Healthy leaves	Mildew affected leaves	Loss in moisture (%)
Variétés	Feuilles saines	Feuilles atteintes par le mildiou	Perte d'eau (%)
V1	75.26	58.12	22.77
MR2	73.68	54.28	26.33
Kanva 2	71.67	52.32	26.99
S 34	73.00	52.85	27.60
DD	71.20	50.00	29.78

Table II. Chlorophyll content in certain varieties of mulberry affected by *Phyllactinia corylea*.Tableau II. Teneur en chlorophylle de certaines variétés de mûrier atteintes par *Phyllactinia corylea*.

Varieties	Chlorophyll content (mg/g) in leaves * Teneur en chlorophylle (mg / g) dans les feuilles *					
	Chlorophyll a Chlorophylle - a		Chlorophyll b Chlorophylle - b		Total chlorophyll Chlorophylle totale	
Variétés	Affected Malades	Healthy Saines	Affected Malades	Healthy Saines	Affected Malades	Healthy Saines
V1	0.43 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.45 ± 0.01
MR 2	0.12 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.53 ± 0.01
Kanva 2	0.29 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.57 ± 0.01
S 34	1.44 ± 0.01	1.73 ± 0.01	1.60 ± 0.01	1.75 ± 0.01	2.60 ± 0.01	3.48 ± 0.02
DD	0.11 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.53 ± 0.01

Data presented in the table are mean and SD values (±) / Les données présentées dans le tableau sont les valeurs moyennes et l'écart type (±).

* Each value represents the mean of five replications / Chaque valeur représente la moyenne de cinq répétitions.

Table III. Effect of feeding mildew affected leaves on mortality and economic parameters of *Bombyx mori* L.

Tableau III. Effet de l'alimentation avec des feuilles de mûrier atteintes par le mildiou sur la mortalité et les paramètres économiques de *Bombyx mori* L.

Parameters	Fourth instar			Fifth instar		
	Mildew affected leaves	Healthy leaves	t value	Mildew affected leaves	Healthy leaves	t value
Paramètres	Quatrième âge			Cinquième âge		
	Feuilles atteintes par le mildiou	Feuilles saines	Valeur t	Feuilles atteintes par le mildiou	Feuilles saines	Valeur t
Mortality (%) / Mortalité (%)	56.00 ± 2.83	0.00 ± 0.00	—	43 ± 1.96	0.00 ± 0.00	—
Larval duration (h.) / Durée larvaire (h.)	195 ± 0.14	168 ± 1.41	2.58	180 ± 0.15	169 ± 1.32	2.61
Laval weight (g) / Poids larvaire (g)	2.92 ± 0.14	3.82 ± 0.16	2.58	3.00 ± 0.13	3.79 ± 0.15	2.58
Cocoon weight (g) / Poids du cocon (g)	1.55 ± 0.03	1.72 ± 0.05	NS	1.62 ± 0.05	1.71 ± 0.04	NS
Shell weight (g) / Poids de la coque (g)	0.24 ± 0.02	0.28 ± 0.01	1.76	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.01	1.42
Shell ratio (%) / Richesse soyeuse (%)	15.48 ± 0.52	16.28 ± 0.52	1.43	15.43 ± 0.53	16.37 ± 0.52	NS
Cocoon yield by number (no) (For 10,000 larvae) Rendement en cocons en nombre (nbre) (Pour 10 000 larves)	4400 ± 8.00	9980 ± 0.02	2.65	5700 ± 7.58	9992 ± 0.02	2.68
Cocoon yield by weight (kg) (For 10,000 larvae) Rendement en cocons au poids (kg) (Pour 10 000 larves)	6.70 ± 0.47	16.98 ± 0.08	2.64	9.23 ± 0.09	17.20 ± 0.08	2.65

Data presented in the table are mean and SD values (±) / Les données présentées dans le tableau sont les valeurs moyennes et l'écart type (±).

Effect of feeding mildew affected leaves on larval duration, mortality and economic parameters:

Larval duration:

The duration of final instar got extended by 27 hrs and 11 hrs respectively for fourth and fifth instar larvae (Tab. III). The present finding corroborates with findings of Iyengar (1975) and Umesh Kumar *et al.* (1993) where they reported an increased larval duration due to feeding of fungi affected leaves.

Larval mortality:

Feeding of mildew affected leaves for fourth and fifth instar worms resulted in 56 and 43 per cent mortality respectively (Tab.III). The stress condition created by feeding poor quality leaves might have predisposed the larva to diseases as these leaves lack antibacterial and antiviral substances. Present finding strengthen the earlier reports of Krishnaswami *et al.* (1973) who opined that feeding of unsuitable leaves was the major causative factor for flacherie and grasserie. Boraiah (1994) reported that leaf quality and climatic condition contributed 38.2 and 37 per cent respectively for successful cocoon production. Manimegalai (2003) demonstrated that feeding of iron deficient leaves pre disposed the larvae to bacterial flacherie.

Economic parameters:

Larval weight, cocoon weight and shell weight:

The larval weight (3.82 g, 3.79 g) and shell weight (0.28 g and 0.28 g) was significantly higher when feeding healthy leaves for fourth and fifth instar worms respectively as against larval weight (2.92 g, 3.00g) and shell weight (0.24 g and 0.25 g) while feeding affected leaves. No significant reduction in cocoon weight was observed by feeding fourth and fifth instar worms with mildew affected leaves.

Cocoon yield:

Significant reduction in yield parameters *i.e.*, cocoon yield by number (4400, 9980) and cocoon yield by weight in kgs (6.70, 16.98) were obtained for 10,000 fourth instar worms when fed with mildew affected and healthy leaves respectively. The cocoon yield by no. (5700, 9992) and cocoon yield by weight in kgs (9.23, 17.20) were recorded when the fifth instar worms were fed with diseased and healthy leaves respectively.

Reports are available on reduction in silkworm rearing performance (Umesh Kumar *et al.*, 1993) and reduction in survival and economic characters (Noamani *et al.*, 1970; Siddaramaiah *et al.*, 1998) due to feeding of rust, mildew and leaf spot affected leaves.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1926) Annual Report of Mycologist Burma for the period ending 30 th June, 1962.
BORAIAH G. (1994) Lecture on Sericulture. SBS Publishers, Distributors, Bangalore. 306 p.
DANDIN S. B.(2000) Mulberry disease and pests- control measures. In. Handbook of Sericulture Technology (Eds.Dandin, S.B., Jayant Jayaswal and K,Giridhar). CSB complex, BTM layout, Madivala, Bangalore.pp 76-77.
HAYASHIYA K., NISHIDA J., MATSUMARA F. (1969) The production of antiviral substances, a red fluorescent protein in the digestive juice of the silkworm larvae. Appl. Ent. Zool., 4: 154-155.
IYENGAR M. N.S. (1975) Effect of feeding mulberry leaves sprayed with morestan on survival and growth of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric.14:1-5.
KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYANA S.K. & KUMARARAJ S. (1973) Sericultural manual 2, Silkworm Rearing, FAO Agricultural Services Bulletin, Rome. 131 p.

- MANIMEGALAI S. (2003) Bacterial pathogens of silkworm, *Bombyx mori*, and its management. Ph.D., Thesis, Tamil nadu Agricultural University, Coimbatore.128 p.
- MANIMEGALAI S. & CHANDRAMOHAN. N. (2005) Bacterial flacherie of silkworm, *Bombyx mori* L. A note on survey and predisposing factors. J. Appl Zool Res : 16(2): 150- 152.
- NOAMANI M.K.R., MUKHERJEE P.K. & KRISHNASWAMI S. (1970) Studies on the effect of feeding multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) larvae with mildew affected leaves. J.Mysore. Univ.28:21-23.
- SADASIVAM S. & MANICKAM A. (1996) Biochemical Methods. New Age International (P) Ltd, New Delhi. pp. 190-192.
- SIDDARAMAIAH A.L. & HEDGE R. K (1988) Effect of feeding *Cercospora* infected leaves of mulberry on silkworm development. Mysore J.Agric.Sci.22:498-504
- SIKDAR A. K. & KRISHASWAMI S. (1980). Assessment of leaf yield loss of mulberry varieties due to leaf spot disease. Indian J Seric., 19:9-12.
- SUNDARESWARAN., GOVINDIAH P., SRINIVASAN E.B. & JOLLY M. S. (1988) Effect of leaf rust disease on nutritive composition of mulberry (*Morus alba* L.). Indian J Seric., 27:159-160.
- TANADA & KAYA (1993) Insect Pathology. Academic Press. San Diego .California. 666 p.
- UMESH KUMAR N.N., SHARMA D.D., SHREE M. P. (1993) Effect of feeding fungus infected mulberry leaves on commercial characters of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J.Seric, 32:107-109.

QUALITE DES FEUILLES DE MURIER ATTEINTES PAR LE MILDIU ET EFFET SUR LES CARACTERES ECONOMIQUES ET SUR LA MORTALITE DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

S. MANIMEGALAI & N. CHANDRAMOHAN

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

*La qualité de la feuille de mûrier est un facteur primordial pour une productivité plus élevée de cocons de qualité, et elle est affectée par de nombreux facteurs, parmi lesquels les maladies sont les plus sérieux. Les feuilles atteintes par le champignon, *Phyllactinia corylea* présentent une diminution de l'eau (22,77 à 29,78 %) et de la chlorophylle de la feuille. L'alimentation des vers à soie du mûrier, *Bombyx mori* du 4^{ème} et du 5^{ème} âge avec des feuilles atteintes par le champignon, *P. corylea*, entraîne l'augmentation de la durée larvaire de respectivement 27 hr et 11 hr. Cela entraîne aussi la mortalité des vers, tout en limitant les paramètres économiques tels que le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse. Les paramètres de rendement, c'est à dire le rendement en cocons en nombre, (4400, 9980) et le rendement en cocons au poids en kg (6,70 ; 16,98) pour 10 000 vers du quatrième âge diminuent considérablement quand on les nourrit respectivement avec des feuilles atteintes par rapport aux feuilles saines. Quand on nourrit les vers du 5^{ème} âge respectivement avec des feuilles malades et saines, on enregistre les rendements suivants de cocons en nombre (5700, 9992) et au poids (9,23 ; 17,20).*

INTRODUCTION

La feuille de mûrier constitue l'unique nourriture du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. C'est une plante qui pousse vite avec des feuilles très riches en protéines, en sucres et en eau. Un certain nombre de facteurs, comme les maladies qui jouent un rôle principal, ont un effet très important sur la teneur en nutriments de la feuille. Les maladies foliaires telles que le mildiou poudreux (*Phyllactinia corylea*) (Pers) Karst, la tache de la feuille (*Cercospora moricola* (Cooke) et la rouille de la feuille, *Cerotelium fici* (Cast) Arth on un effet sur la culture du mûrier et sur la croissance normale et le rendement du mûrier. L'alimentation avec des feuilles malades a un effet défavorable sur la croissance et sur la santé du ver à soie, ce qui entraîne l'échec partiel ou parfois complet des récoltes de cocons et diminue la qualité commerciale des cocons produits (Dandin, 2000). Des rapports ont déjà été publiés sur l'effet défavorable des feuilles atteintes par la tache (Sikdar et Krishaswami, 1980) et par la rouille de la feuille (Umesh Kumar et coll., 1993) sur le rendement en cocons.

La maladie du mildiou poudreux est très importante dans la zone de Nilgiris du Tamil Nadu et dans les collines B. R. de l'état du Karnataka pendant les mois d'août et de novembre, où on observe une croissance cotonneuse épaisse du champignon sur la surface inférieure des feuilles. Cependant, cette maladie est aussi sévère dans les plaines en novembre, en décembre et en janvier, où elle doit être surveillée. Dans cette étude, nous avons donc essayé d'évaluer la teneur en nutriments des feuilles atteintes par le mildiou ainsi que son impact sur la mortalité et sur les paramètres économiques de *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

Effet de l'alimentation avec des feuilles atteintes par le mildiou :

Nous avons réalisé deux expériences en laboratoire pour étudier l'effet des feuilles de mûrier atteintes par le mildiou sur la mortalité et sur les paramètres économiques de *B. mori*. Dans la première expérience, on nourrit les larves sortant de la 3^{ème} mue avec des feuilles malades jusqu'à la quatrième mue et dans la deuxième expérience, on nourrit les vers sortant de la 4^{ème} mue avec des feuilles malades jusqu'au filage. Pendant la période qui reste, on nourrit les vers avec des feuilles saines. On utilise l'hybride PM × NB4D2 pour l'expérience et on procède à l'élevage d'après la méthode de Krishnaswami et coll., (1973). Chaque expérience est constituée de deux traitements, répétés huit fois à raison de 50 larves / répétition. On procède à des observations sur la durée larvaire du cinquième âge, sur la mortalité larvaire et sur les paramètres économiques tels que le poids larvaire, le poids du cocon et le poids de la coque. On enregistre les paramètres de rendement comme le rendement en cocons en nombre et au poids.

Teneur en nutriments de la feuille :

On estime la teneur en eau et en chlorophylle des feuilles malades et saines chez les variétés exploitées sur le plan commercial, telles que V1, MR2, Kanva 2, S34 et DD. On estime la chlorophylle a, b et la chlorophylle totale par la spectrophotométrie (Sadavisam et Manickam, 1996).

$$\text{Chlorophylle a (mg / g)} = \frac{12.7 (\text{OD } 663) - 2.69 (\text{OD } 645)}{1000} \times \frac{V}{W}$$

$$\text{Chlorophylle b (mg / g)} = \frac{22.9 (\text{OD } 645) - 4.68 (\text{OD } 663)}{1000} \times \frac{V}{W}$$

$$\text{Chlorophylle totale} = \frac{20.2 (\text{OD } 645) + 8.02 (\text{OD } 652)}{1000} \times \frac{V}{W}$$

V = Volume final de l'extrait en ml

W = Poids de l'échantillon de feuille pris pour l'estimation

RESULTATS ET DISCUSSION

Teneur en nutriments de la feuille :

Teneur en eau :

On observe une perte importante en eau de la feuille chez les variétés V1 (22,77 %), MR 2 (26,33 %), Kanva 2 (26,99 %), S34 (27,60%) et DD (29,78 %) (Tableau I). La teneur en eau des feuilles a un effet important sur la saveur de la feuille pour les vers, ce qui à son tour a un effet sur la croissance des vers et peut entraîner la diminution du rendement. Sundareswarana et coll., (1988) ont publié un rapport sur la diminution de l'eau chez les feuilles atteintes par le champignon.

Chlorophylle de la feuille :

On observe une diminution importante de la teneur en chlorophylle a, b et totale chez les feuilles des variétés de mûrier, V1, MR2, Kanva 2, S34 et DD atteintes par le mildiou. On estime la teneur totale en chlorophylle en mg / g respectivement chez les feuilles atteintes et saines des différentes variétés V1 (0,38 ; 0,45) ; MR 2 (0,45 ; 0,53) ; Kanva 2 (0,41 ; 0,57) S 34 (2,60 ; 3,48) et DD (0,43 ; 0,53). La teneur en chlorophylle a un rôle significatif dans le mécanisme de résistance du ver à soie aux maladies puisqu'elle est responsable de la production de la protéine fluorescente rouge, qui a des propriétés antivirales. Hayaskiya et coll., (1969) ont publié un rapport sur le rôle de la

chlorophylle dans la résistance à la maladie. Tanada et Kaya (1993) ont réalisé un rapport sur le rôle du caryophyllène pour inhiber la croissance des micro-organismes chez les insectes. Après une étude réalisée dans les principales zones d'élevage du ver à soie dans le Tamil Nadu, Manimegalai et Chandramohan (2005) ont rapporté que la qualité de la feuille est un facteur principal par rapport à l'éruption de la flacherie. Iyengar (1975) a rapporté des changements importants de teneur en eau, en chlorophylle, en carotène et en polyphénol chez les feuilles de mûrier malades.

Effet de l'alimentation avec des feuilles de mûrier atteintes par le mildiou sur la durée larvaire, la mortalité et sur les paramètres économiques :

Durée larvaire :

La durée du dernier âge est prolongée respectivement de 27 heures et de 11 heures pour les larves du quatrième et du cinquième âge (Tableau III). Ces observations confirment celles d'Iyengar (1975) et d'Umesh Kumar et coll., (1993) qui ont rapporté une augmentation de la durée larvaire à cause de l'alimentation avec des feuilles atteintes par le champignon.

Mortalité larvaire :

L'alimentation des vers du quatrième et du cinquième âge avec des feuilles atteintes par le mildiou entraîne une mortalité de respectivement 56 et 43 % (Tableau III). La création de conditions de stress, par l'alimentation avec des feuilles de mauvaise qualité, pourrait avoir prédisposé les larves à des maladies, puisque ces feuilles manquent de substances antibactériennes et antivirales. Les observations actuelles confirment les rapports antérieurs de Krishnaswami et coll., (1973), selon lesquels l'alimentation avec des feuilles non adaptées est le principal facteur responsable de la flacherie et de la grasserie. Boraiah (1994) a rapporté que la qualité de la feuille et les conditions climatiques contribuent respectivement à 38,2 et 37 % à la réussite de la production de cocons. Manimegalai (2003) a prouvé que l'alimentation avec des feuilles déficientes en fer prédisposent les larves à la flacherie bactérienne.

Paramètres économiques :

Poids larvaire, poids du cocon et poids de la coque :

Quand on nourrit les vers du quatrième et du cinquième âge avec des feuilles saines, le poids larvaire (3,82 g ; 3,79 g) et le poids de la coque (0,28 g et 0,28 g) sont considérablement plus élevés, que lorsqu'on les nourrit avec des feuilles malades (poids larvaire de 2,92 g ; 3 g et poids de la coque de 0,24g et 0,25 g). Lorsqu'on nourrit les vers du quatrième et du cinquième âge avec des feuilles atteintes par le mildiou, on n'observe pas de diminution significative du poids du cocon.

Rendement en cocons :

On obtient une variation importante des paramètres de rendement, c'est à dire du rendement en cocons en nombre (4400, 9980) et en poids au kg (6,70 ; 16,98) pour 10 000 vers du quatrième âge, quand on les nourrit respectivement avec des feuilles atteintes par le mildiou et saines. On enregistre le rendement de cocons en nombre (5700, 9992) et en poids au kg (9,23 ; 17,20) lorsqu'on nourrit les vers du 5^{ème} âge avec respectivement des feuilles malades et saines.

Plusieurs rapports ont été publiés sur la diminution de la performance d'élevage du ver à soie (Umesh Kumar et coll., 1993) et sur la diminution des caractères économiques et de survie (Noamani et coll., 1970 ; Siddaramaiah et coll., 1998) à cause de l'alimentation avec des feuilles atteintes par la rouille, le mildiou et la tache de la feuille.

COMPARATIVE PERFORMANCE OF *TEPHROSIA PURPUREA* (FABACEAE) AND *SESBANIA ACULEATA* (FABACEAE) IN IMPROVING THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF SOIL OF MULBERRY FIELD – A FIRST REPORT

S. MASILAMANI, S. M. H. QADRI, A. GUHA, S. JAYARAJ* & S. B. DANDIN**

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Govt. of India, Allikuttai Post, Veeranam Road, Salem-636 003, Tamil Nadu, India.

Soil profiles of 10 mulberry gardens of the project site in Salem district, Tamil Nadu covering 4 villages were dug opened. The profiles represented Alfisols, which contained argillic horizons in the surface, as crusts, and in the sub-surface, as a hard pan or impervious layer, at a depth of 20-30 cm. Two types of green manure cover crops i. e., *Tephrosia purpurea* and *Sesbania aculeata* were raised each in 0.4 ha in the inter-rows of mulberry plantations (Var. V-1) in two rainy seasons (Oct-Dec '05 and Jun-Aug '06). Observations on green manure biomass, height of the plant, number and weight of nodules, length and weight of the root on 45th day after sowing (DAS) were recorded. Chemical analysis was also carried out for NPK content of green manures. Both the green manure cover crops were uprooted manually in order to disturb the sub-soil hard pan or impervious layer and incorporated in the soil of mulberry fields. Data on the root population of mulberry in 4 depths of soil (0-10, 11-20, 21-30 and 31-40 cm) including rate of water infiltration/h were collected. These data were subjected to simple statistical analysis using 'Student t' test. It was observed that *T. purpurea* produced a higher biomass (6.72 mt/ha/crop) with an average root length / weight of 34.2 cm/4.8 g than *S. aculeata* (biomass 5.4 mt/ha/crop; root length/weight 14.0 cm/1.2 g). Chemical analysis revealed higher N content in *T. purpurea* (3.4 %) than *S. aculeata* (3.14%), which is attributed to the deep rooting ability of the former in breaking the sub soil hard pan and in utilizing the nutrients available below 30 cm of soil. The P and K contents were found to be higher in *S. aculeata* (0.41% and 2.75) than in *T. purpurea* (0.32% and 2.4%). A comparative lower number and weight of nodules were found in *T. purpurea* (4 and 0.2 g) than *S. aculeata* (7 and 0.6 g). Significant increase in mulberry leaf yield and root penetration of mulberry plant below the sub-soil hard pan (below 30 cm) were recorded in the *T. purpurea* raised plots. Thus *T. purpurea* green manuring in mulberry is a new crop which is recommended to be raised alternatively with *S. aculeata* to disturb the sub soil hard pan and to improve the physicochemical properties of the soils presenting problems in their profiles.

Keywords: *Tephrosia purpurea*, *Sesbania aculeata*, *Morus alba*, mulberry, subsoil hardpan, physiochemical properties of soil, green manure.

* Sustainable Farm & Rural Development Centre, S. Jayaraj Research Foundation, Chennai – 600 042, Tamil Nadu, India.

** Central Sericultural Research & Training Institute, Central Silk Board, Govt. of India, Mysore – 570 008, Karnataka, India.

INTRODUCTION

The sustainability of mulberry farming largely depends on maintenance of favourable soil physicochemical and biological environment. With the advent of new bivoltine tropical sericulture technologies, the productivity is increasing in an upward trend. At the same time, there is a change in soil nature, an increased incidence of pests and of root bound diseases i. e., root-rot etc., which eventually adversely affect the productivity per unit area. Under such circumstances improving soil health through green manuring or other organic sources of nutrients shall help overcome aforesaid problem and boost the mulberry productivity with minimum cost involvement. This decrease in costs simultaneously results in an increased profit.

The common soils in tropical areas are Alfisols, Ultisols and Oxisols. These soils present argillic horizons, indicating that clay particles can move easily within the soil profiles (Foth, 1984). Such horizons are present in the surface as crusts and in the sub-surface as a hard pan or impervious layer (Ramanathan *et al.* 1983). When such impervious layers are to be found at shallow depths they pose agronomic problems due to the inherent physical properties as high bulk density and penetration resistance, thereby, the optimal use of the subsoil by the roots is restricted, consequently there is poor yield (Mathan and Ramanathan, 1999). This type of hard pan in the soil at shallow depths (21-30 cm) was observed in a certain number of mulberry holdings selected for Farmers Participatory Research projects under Integrated Nutrient and Pest Management (INM-IPM) and Integrated Farming System Management (IFSM) in Salem district of Tamil Nadu, India. The soil of mulberry gardens with hard pans at shallow depths despite having the potential fertility produced low leaf yields due to poor aeration, lower hydraulic conductivity and restricted root penetration resulting in limited soil volume availability. These physical problems are normally alleviated by chisel ploughing. The present work is an attempt to evaluate two types of green manures cover crops for their efficacy to improve the physical properties of the Alfisol type of soil by break opening subsoil hard pan through their root penetration abilities. The perusal of literature indicated that the use of *T. purpurea* as green manure intercrop in mulberry to improve physicochemical properties of soil has not been reported earlier, and therefore, has been claiming a first report by the authors.

MATERIALS AND METHODS

Soil profile of mulberry field of project site i. e., Thammampatty cluster of Salem district, Tamil Nadu, India was dug opened. The profile represented Alfisols. The soil presented argillic horizons which are found in the surface as crusts and in the sub-surface as a hard pan or impervious layer at a depth of 20-30 cm.

Tephrosia purpurea (Linn.) Pers., which belongs to the family Fabaceae, is a wild plant known as "Sarapunkha" in Sanskrit, "Purple tephrosia" or "Wild indigo" in English and "Avuri" or "Kolinji" in Tamil. It is a deep rooted, self sowing and drought tolerant legume. *Sesbania aculeata* Poir. a member of the same family as that of *T. purpurea* known as "Dhaincha" in Sanskrit, "Sesbania" in English and "Thakka poondur" in Tamil, is a shallow rooted legume and commonly used as a green manure cover crop under irrigated conditions in a variety of cropping systems in India. Seeds of *T. purpurea* (seed rate is 12.5 kg/ha crop) and *S. aculeata* (seed rate is 25.00 kg/ha crop) were sown on the 2nd day after pruning of mulberry plants and raised as a green manure intercrop between the paired row [(1.5 m + 0.9 m) x 0.6 m] of mulberry plots in two rainy seasons (Oct-Dec'05 and Jun-Aug'06). Each of them was sown in 0.4 ha land and no rhizobium inoculum was applied to any of the legumes. The variety of mulberry was V-1 and the age of plantation was three years. Standard cultural operations as recommended for irrigated mulberry by Dandin *et al.*, (2000) were followed. Growth observation of both the green manures were recorded in 10 randomly selected micro plots (1.5 m x 1.5 m) on biomass, plant height, number of nodules, weight of the nodules, length and weight of the root on plant basis on 45th day after sowing (DAS). Chemical analysis was also carried out for

NPK content of the green manures. Both the green manure intercrop were uprooted manually in order to disturb the sub-soil hard pan or impervious layer and incorporated in the soil of mulberry field. Undisturbed soil core samples representing four depths i.e., 0-10, 11-20, 21-30 and 31-40 cm were collected and rate of water infiltration/h recorded by using standard procedure (Gupta and Dakshinamurti, 1981). Observations were also recorded for mulberry root population classified under fibrous or feeder, medium thick, thick and total number of roots in four depths of soil i.e., 0-10, 11-20, 21-30 and 31-40 cm. 'Student t' test was employed for assessing significant differences between the treatment (*T. purpurea*) and control (*S. aculeata*) plots.

RESULTS AND DISCUSSION

i) Biomass production and NPK supplementation by green manures:

Comparative rate of growth and biomass production of the two green manure intercrops are presented in Table I. *T. purpurea* produced an higher biomass (6.72 mt/ha crop) with an average root length/weight of 34.2 cm/4.8 g than *S. aculeata* (biomass 5.4 mt/ha crop; root length/weight 14.0 cm/1.2 g). Both the green manure crops were effective in improving soil productivity, probably due to high biomass production, N₂ fixation and recovery of leached nitrates (Wortmann & Kaizzi, 2000). Chemical analysis revealed that the N content was found to be higher in *T. purpurea* (3.4 %) than *S. aculeata* (3.14%) which is attributed to the deep rooting ability of the former in breaking the subsoil hard pan and utilizing the nutrients available below 30 cm of soil depth. The P and K content were found to be higher in *S. aculeata* (0.41% and 2.75%) than *T. purpurea* (0.32% and 2.4%). The advantage of legumes as green manure cover crops is their ability to fix atmospheric N through their symbiotic relationship with *Rhizobium* spp., usually associated with the host's root system as nodules. Number and weight of nodules were found to be comparatively less in *T. purpurea* (4 and 0.2g) than *S. aculeata* (7 and 0.6 g) (Table I).

ii) Influence of two types of green manures on mulberry leaf yield:

The treatment effect on mulberry leaf yield is furnished in Table I. The leaf yield of mulberry in *T. purpurea* raised mulberry plot was found to be higher (10460 kg/ha crop) than *S. aculeata* (9323 kg/ha crop) and the difference was found to be statistically significant. Comparative study made by Wortmann and Kaizzi (2000) also reported that maize crop yields were found to be higher in *T. purpurea* raised cover crops than in *S. aculeata*. Hagedorn *et al.* (1997) found that 25% of the N in *Tephrosia* plant material (2.85% N) was mineralized within the first five days after incorporating the biomass. Better soil physical and chemical environment for increased leaf yield in mulberry could be attributed to the rapid rate of mineralization and deep rooting ability of *T. purpurea* in break opening the subsoil hardpan.

iii) Improvements in physical properties of soil:

Comparatively, mulberry root penetration and number was higher in *T. purpurea* raised plots than *S. aculeata* at different depths of soil under study except the top layer of soil i.e., 1-10 cm and the differences were found to be statistically significant (Table II). This clearly indicated that extensive and deep rooting ability of *T. purpurea* loosened or open-up the impervious layer or subsoil hardpan resulting in aerating the soil which facilitated the mulberry roots to penetrate deeper below the subsoil hardpan. Soil surface crusting and subsoil hardpan are the common problem in semi arid and arid soils.

Among the various soil physical properties, water infiltration determines the productivity potential of soil and is one of the important factors controlling agricultural production (Ramanathan *et al.*, 1983). Due to clay dispersion, clogging of soil pores or swelling of monovalent cations, the infiltration rate is drastically reduced (Helalia *et al.*, 1988).

Table I. Growth parameters of green manures and mulberry leaf yield. (Mean value of two seasons).

Tableau I. Paramètres de croissance des engrais verts et rendement foliaire du mûrier. (Valeur moyenne de deux saisons).

Sl. No.	Green manure	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Plant height (cm)	Root weight (g)	Shoot weight (g)	Biomass (g) / plant	Mulberry leaf yield (kg/ha crop)
No. de série	Engrais verts	Longueur de la pousse (cm)	Longueur de la racine (cm)	Hauteur de la plante (cm)	Poids de la racine (g)	Poids de la pousse (g)	Biomasse (g) / plant	Rendement foliaire du mûrier (kg / ha / récolte)
1	<i>Tephrosia purpurea</i>	45.3 ± 1.95	34.2 ± 0.37	79.5 ± 2.24	4.862 ± 0.04	14.19 ± 0.36	19.043 (6720) ± 0.4	10460 ± 59.9
2.	<i>Sesbania aculeata</i>	54.1 ± 0.97	13.9 ± 0.80	68 ± 1.54	1.213 ± 0.09	10.919 ± 0.27	12.132 (5400) ± 0.37	9323 ± 62.5
	t value	1.34	4.67	1.2	9.2	2.76	3.96	4.06
	Valeur t	NS	**	NS	**	*	**	**

± Standard Error of the mean value / Ecart type de la valeur moyenne.

(Figures in parenthesis denote kg/ha crop) / (Les chiffres entre parenthèses signifient kg / ha / récolte)

*, ** Significant at 5% and 1% levels of probability / Significatif aux seuils de probabilité de 5 % et de 1 %.

Table II. Number of mulberry roots at different depths of soil.

Tableau II. Nombre de racines de mûrier à différentes profondeurs du sol.

Green manure raised mulberry plots	Number of roots / mulberry plant in different depths of soil			
	Fibrous roots	Medium thick roots	Thick roots	Total number of roots
	<i>Nombre de racines / plant de mûrier à différentes profondeurs du sol</i>			
<i>Parcelles de mûrier cultivées avec des engrais vert</i>	<i>Racines fibreuses</i>	<i>Racines moyennement épaisses</i>	<i>Racines épaisses</i>	<i>Nombre total de racines</i>
<i>Tephrosia purpurea</i>				
1) 0-10 cm depth 0-10 cm de profondeur	10.1 ± 0.24	2.7 ± 0.13	1.2 ± 0.08	14 ± 0.35
2) 11-20 cm depth 11-20 cm de profondeur	28.2 ± 0.44	2.9 ± 0.1	1.2 ± 0.09	32.2 ± 0.37
3) 21-30 cm depth 21-30 cm de profondeur	9.4 ± 0.29	1.6 ± 0.11	1.1 ± 0.09	12.1 ± 0.28
4) 31-40 cm depth 31-40 cm de profondeur	4.2 ± 0.12	0.4 ± 0.05	0.0 ± 0.0	4.6 ± 0.13
<i>Sesbania aculeata</i>				
1) 0-10 cm depth 0-10 cm de profondeur	14.9 ± 0.21	2.8 ± 0.15	0.2 ± 0.04	17.9 ± 0.29
2) 11-20 cm depth 11-20 cm de profondeur	18.9 ± 0.27	0.8 ± 0.09	0.2 ± 0.04	20.0 ± 0.26
3) 21-30 cm depth 21-30 cm de profondeur	3.8 ± 0.19	0.4 ± 0.07	0.3 ± 0.05	4.5 ± 0.20
4) 31-40 cm depth 31-40 cm de profondeur	0.5 ± 0.007	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.07
't' value / valeur "t"				
1) 0-10 cm depth 0-10 cm de profondeur	** (4.13)	NS (0.13)	* (3.35)	NS (2.34)
2) 11-20 cm depth 11-20 cm de profondeur	** (5.13)	** (4.85)	* (3.35)	** (7.61)
3) 21-30 cm depth 21-30 cm de profondeur	** (4.07)	* (3.09)	NS (2.45)	** (6.22)
4) 31-40 cm depth 31-40 cm de profondeur	** (7.15)	NS (2.45)	0.0	** (8.13)

± Standard Error of the mean value / Ecart type de la valeur moyenne.

*, ** Significant at 5% and 1% levels of probability / Significatif aux seuils de probabilité de 5 % et de 1 %.

Table III. Rate of Water infiltration (cm/hr) at four different depths.

Tableau III. Taux d'infiltration de l'eau (cm / hr) à quatre profondeurs différentes.

Green manure raised mulberry plots	Rate of water Infiltration
<i>Parcelles de mûrier cultivées avec des engrais verts</i>	<i>Taux d'infiltration de l'eau (cm/hr)</i>
<i>Tephrosia purpurea:</i>	
1) 0 -10 cm depth 0 – 10 cm de profondeur	9.0 ± 0.11
2) 11- 20 cm depth 11-20 cm de profondeur	7.5 ± 0.07
3) 21- 30 cm depth 21-30 cm de profondeur	5.5 ± 0.09
4) 31- 40 cm depth 31-40 cm de profondeur	11.0 ± 0.11
<i>Sesbania aculeata</i>	
1) 0 -10 cm depth 0 – 10 cm de profondeur	6.5 ± 0.08
2) 11- 20 cm depth 11 – 20 cm de profondeur	4.0 ± 0.08
3) 21-30 cm depth 21 – 30 cm de profondeur	3.0 ± 0.07
4) 31- 40 cm depth 31 – 40 cm de profondeur	9.5 ± 0.12
<i>'t' value / valeur "t"</i>	
1) 0 -10 cm depth 0 – 10 cm de profondeur	** (5.59)
2) 11- 20 cm depth 11 – 20 cm de profondeur	** (10.25)
3) 21-30 cm depth 21 – 30 cm de profondeur	** (5.93)
4) 31- 40 cm depth 31 – 40 cm de profondeur	** (3.87)

± Standard Error of the mean value / Ecart type de la valeur moyenne.

*, ** Significant at 5% and 1% levels of probability / Significatif aux seuils de probabilité de 5 % et de 1 %.

Structural disturbance of rain drops impact and sorting action of water flowing over the soil surface also reduces infiltration of such soils to large extent. The entrapped air also contributes to the water infiltration rate of the soil (Suarez *et al.*, 1984). The comparative rate of water infiltration of the experimental soil collected from the *S. aculeata* and *T. purpurea* raised as green manure intercrop in mulberry are furnished in Table III. The rate of water infiltration of soil was influenced by two types of green manures which varied significantly among themselves due to varying rooting action (Table II). Rate of water infiltration was found to be high in *T. purpurea* raised mulberry plots than *S. aculeata* and the difference was found to be statistically significant (Table III).

The soil at 20-30 cm depth was found to be matured medium to heavy textured and reddish brown soils with an argillic horizon. The length of the roots of *S. aculeata* was recorded and found to be in the range of 10.0 to 21.0 cm with the mean value of 13.9 cm (Table I) which therefore could not break open the subsoil hardpan found in 20-30 cm depth of soil and rate of water infiltration was also found to be low in this layer (Table III). The deep taproots of *T. purpurea* green manure intercrop performed like a "biological plow" in penetrating compacted hardpan subsoil and reached up to a depth of 40-50 cm which when uprooted provided soil loosening effects of the deep tillage treatment (Tables I & II). The rate of water infiltration in both the treatment plots at 31-40 cm was found to be rated as rapid (Table III). This was due to gravelly loamy sand texture found below the subsoil hardpan.

CONCLUSION

A comparative performance of two types of green manures *i.e.*, shallow rooted (*S. aculeata*) and deep rooted (*T. purpurea*) legumes studied to improve the physicochemical properties of soil containing argillic horizons in the surface as crusts and in the sub-surface as a hard pan or impervious layer found at a depth of 20-30 cm indicated that *T. purpurea* produced significantly high biomass, N supplementation on par with *S. aculeata*, and lengthy tap roots which penetrated and damaged the sub soil hard pan or impervious layer. Mulberry root development below 30 cm soil depth with significant increase in leaf yield was found to be observed in the *T. purpurea* raised mulberry plots. This could be attributed to opening of sub soil hard pan or impervious layer by the deep root system of *T. purpurea* which led to better soil aeration, water infiltration, avoiding run-off or leaching of nutrients, facilitated mulberry root penetration in deeper soil layer and increased fertilizer/nutrients use efficiency below the sub soil hard pan. Thus *T. purpurea* green manuring in mulberry is a new report which is recommended to be raised alternatively with *S. aculeata* to disturb the sub soil hard pan and to improve the physicochemical property of the problem soils. This new technology needs to be percolated in farmers fields to take the mulberry root system deeper in order to improve and sustain mulberry productivity.

REFERENCES

- DANDIN S.B., JAYASWAL J., GIRIDHAR K. (2000) Hand book of sericulture technologies: Package of practices for mulberry cultivation under irrigated condition. Central Silk Board, Bangalore, pp. 38-44.
- HAGEDORN F., STEINER K.G., SEKAYANGE L., ZECH W. (1997) Effect of rainfall pattern on nitrogen mineralisation and leaching in a green manure experiment in South Rwanda. Plant and Soil, 195:365-375.
- HELAHIA M., LATEY J., GRAHAM R.C. (1988) Crust formation and clay migration effects on infiltration rate. Soil Sci. Soc. Am. J., 52:251-255.
- FOTH H.D. (1984) Fundamentals of soil science. 7th ed. John Wiley & Sons. New York, pp. 21-62.
- GUPTA R.P., DAKSHINAMURTI C. (1981) Procedures for physical analysis of soils and collection of Agrometeorological data. Division of Agricultural Physics, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, pp.18.

- MATHAN K.K., RAMANATHAN S. (1999) Influences of organic wastes and chiseling on the soil physical properties and yield of sorghum (CO 24) in alfisols with hard pan subsoil. *Madras Agric. J.*, 86:532-35.
- RAMANATHAN K.M., RAMANATHAN S., YAMARAMAN C., RAVIKUMAR K.V., PALANIVEL S. (1983) Effect of chiseling and amendments on the management of soils having impervious layer at shallow depths. *Madras Agric. J.*, 70(4):1246-250.
- SUAREZ D.L., RHODES J.D., LAVADO R., GRIEVE C.M. (1984) Effect of pH on saturated hydraulic conductivity and soil dispersion. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 48 :50-55.
- WORTMANN C.S., KAIZZI, C.K. (2000) Tree legumes in medium-term fallows: Nitrogen fixation, nitrate recovery and effects on subsequent crops. *African Crop Sci. J.*, 8:263-272.

PREMIER RAPPORT SUR LA PERFORMANCE COMPARATIVE DE *TEPHROSIA PURPUREA* (FABACEAE) ET DE *SESBANIA ACULEATA* (FABACEAE) POUR L'AMELIORATION DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DU SOL DANS LES MURAIES

S. MASILAMANI, S. M. H. QADRI, A. GUHA, S. JAYARAJ & S. B. DANDIN

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Govt. of India, Allikuttai Post,
Veeranam Road, Salem – 636 003, Tamil Nadu, Inde.

Nous avons sondé les profils de sol de 10 muraies du site opérationnel de la zone de Salem, regroupant 4 villages, dans le Tamil Nadu. Les profils représentent des Alfisols, qui contiennent des horizons argileux, à la surface comme croûtes, et en dessous de la surface à une profondeur de 20 à 30 cm, comme croûte dure ou couche imperméable. On cultive deux types d'engrais verts recouvrants, *Tephrosia purpurea* et *Sesbania aculeata*, chacun sur 0,4 ha, entre les rangées des plantations de mûrier (Var. V-1) pendant les deux saisons des pluies (oct-Dec. 05 et juin – août 06). On enregistre les observations sur la biomasse, la hauteur du plant, le nombre et le poids de nodules, la longueur et le poids de la racine des engrais verts 45 jours après les semailles. On procède aussi à une analyse chimique de la teneur en NPK des engrais verts. On déracine manuellement les cultures d'engrais verts recouvrants, de manière à rompre la croûte dure ou la couche imperméable du sous-sol et on les incorpore dans le sol des muraies. On recueille les données sur la population de racines du mûrier à 4 profondeurs du sol (0-10 ; 11-20 ; 21-30 et 31 – 40 cm) et également sur le taux d'infiltration de l'eau / h. On soumet ces données à une analyse statistique simple en utilisant le test "t de Student". On constate que *T. purpurea* produit plus de biomasse (6,72 t / ha / récolte) avec une longueur / et un poids moyens des racines de 34,2 cm / 4,8 g plus que *S. aculeata* (biomasse 5,4 t / ha / récolte ; longueur / poids de racine 14 cm / 1,2 g). L'analyse chimique révèle une teneur plus élevée en azote chez *T. purpurea* (3,4 %) que chez *S. aculeata* (3,14 %), que l'on attribue à une capacité de racinement profonde du premier, qui permet de rompre la croûte dure du sous-sol et d'utiliser les nutriments disponibles à 30 cm de profondeur. Les teneurs en phosphore et en potassium s'avèrent plus élevées chez *S. aculeata* (0,41 % et 2,75) que chez *T. purpurea* (0,32 % et 2,4 %). On constate un nombre et un poids comparativement plus faibles de nodules chez *T. purpurea* (4 et 0,2 g) que chez *S. aculeata* (7 et 0,6 g). On enregistre une augmentation significative du rendement en feuilles de mûrier et de la pénétration des racines du plant de mûrier en dessous de la croûte dure de sous-sol (en dessous de 30 cm) chez les parcelles cultivées avec *T. purpurea*. La culture de l'engrais vert *T. purpurea* chez le mûrier est donc une nouvelle culture recommandée comme culture alternée avec *S. aculeata* pour rompre la croûte dure du sous-sol et pour améliorer les propriétés physico-chimiques des sols présentant des problèmes de profils.

INTRODUCTION

La durabilité de la culture du mûrier dépend en grande partie du maintien d'un environnement physico-chimique et biologique du sol favorable. Avec l'apparition de nouvelles technologies pour la sériciculture tropicale bivoltine, la productivité connaît une tendance à la hausse. Parallèlement, on observe un changement de la nature du sol, l'augmentation de la fréquence des parasites et des

maladies liées aux racines, comme la pourriture de la racine, etc... qui finissent par avoir une influence négative sur la productivité par unité de surface. Dans de telles circonstances, l'amélioration de l'état du sol par les engrais verts ou par d'autres sources organiques de nutriments devrait permettre de surmonter les problèmes mentionnés plus haut et d'accroître la productivité du mûrier au moindre coût. Cette baisse des coûts entraîne simultanément une augmentation des profits.

Les sols courants dans les zones tropicales sont des Alfisols, des Ultisols et des Oxisols. Ces sols présentent des horizons argileux, ce qui indique que les particules d'argile peuvent se mouvoir facilement dans les profils de sol (Foth, 1984). De tels horizons sont présents à la surface en tant que croûte et à la sous-surface comme croûte dure ou couche imperméable (Ramanathan et coll., 1983). Quand on trouve de telles couches imperméables à de faibles profondeurs, elles posent des problèmes agronomiques en raison de leurs propriétés physiques inhérentes, comme la densité apparente et la résistance de pénétration élevées et donc l'utilisation optimale du sous-sol par les racines est restreinte, ce qui par conséquent donne un mauvais rendement (Mathan et Ramanathan, 1999). On a observé ce type de croûte dure dans le sol à de faibles profondeurs (21-30 cm) chez un certain nombre de muraies sélectionnées pour des Projets de Recherche Participatifs avec les Fermiers dans le cadre de Systèmes de Gestion des Parasites et des Nutriments Intégrés (INM-IPM) et de Gestion de l'Agriculture Intégrée (IFSM) dans la zone de Salem, dans le Tamil Nadu, en Inde. Bien que le sol des muraies, avec des croûtes dures à de faibles profondeurs, ait une fertilité potentielle, il donne de faibles rendements en feuilles en raison de la mauvaise aération, de la conductivité hydraulique plus faible et de la pénétration restreinte des racines, ce qui entraîne la limitation du volume de sol disponible. En général on peut diminuer ces problèmes physiques par le labour à la pioche. Dans cette étude, nous avons essayé d'évaluer l'efficacité de deux types de cultures d'engrais verts recouvrants, pour améliorer les propriétés physiques du sol de type Alfisol en rompant la croûte dure de sous-sol, grâce à la capacité de pénétration de leurs racines. L'examen de la littérature montre qu'il n'y a pas eu de rapport antérieur sur l'amélioration des propriétés physico-chimiques du sol grâce à l'utilisation de *T. purpurea* comme engrais vert, intercalé chez le mûrier et les auteurs estiment donc que c'est le premier rapport sur le sujet.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons sondé le profil de sol d'une muraille impliquée dans un projet opérationnel, c'est à dire le regroupement de Thammampathy de la zone de Salem, dans le Tamil Nadu, en Inde. Le profil représente des Alfisols. Le sol présente des horizons argileux que l'on trouve à la surface comme croûte et à la sous-surface comme croûte dure ou couche imperméable à une profondeur de 20 à 30 cm.

Tephrosia purpurea (Linn.) Pers., qui appartient à la famille des Fabaceae, est une plante sauvage connue sous le nom de " Sarapunkha " en Sanskrit, de " Purple tephrosia " ou " d'Indigo sauvage " en anglais et " d'Avuri " ou de " Kolinji " en Tamul. C'est une légumineuse à racines profondes, qui se sème elle-même et tolère la sécheresse. *Sesbania aculeata* Poir, un membre de la même famille que *T. purpurea*, connue sous le nom de " Dhaincha " en sanskrit, de " Sesbania " en anglais et de " Thakka poondu " en Tamul, est une légumineuse aux racines peu profondes, couramment utilisée comme culture d'engrais vert recouvrant, dans des conditions d'irrigation, pour un ensemble de systèmes de culture en Inde. On sème les graines de *T. purpurea* (taux de de 12,5 kg / ha) et de *S. aculeata* (taux de 25 kg / ha) le 2^{ème} jour après la taille des plants de mûrier et on les cultive comme culture d'engrais verts intercalés entre deux rangées [(1,5 m + 0,9 m) × 0,6 m] de parcelles de mûrier, pendant les deux saisons des pluies (oct-déc 05 et juin-août 06). On sème chacun d'eux sur 0,4 ha de terrain et on n'applique aucun inoculum de rhizobium à aucune des légumineuses. La variété de mûrier est V-1 et la plantation est âgée de trois ans. On procède aux opérations culturales habituelles d'après les recommandations de Dandin et coll., (2000) pour la culture de mûrier irrigué. On enregistre les observations sur la croissance des deux engrais verts dans 10 micro-parcelles (1,5 m × 1,5 m) sélectionnées au hasard, sur la biomasse, la hauteur du plant, le nombre de nodules, le poids des

nodules, la longueur et le poids de la racine, relevés 45 jours après les semences. On procède aussi à l'analyse chimique pour la teneur en NPK des engrais verts. On déracine manuellement les deux cultures d'engrais verts intercalés, de manière à rompre la couche dure ou la couche imperméable de sous-sol et on les incorpore au sol de la muraie. On recueille des échantillons de carottes de sol représentant quatre profondeurs c'est à dire, 0-10, 11-20, 21-30 et 31-40 cm et on enregistre le taux d'infiltration de l'eau / h en utilisant une procédure standard (Gupta et Dakshinamurti, 1981). On enregistre aussi les observations sur la population de racines du mûrier, classées comme fibreuses ou racines de réserve, moyennement épaisses, épaisses ainsi que le nombre total de racines aux quatre profondeurs de sol. On utilise le test t de Student pour évaluer les différences significatives entre les parcelles traitées (*T. purpurea*) et témoins (*S. aculeata*).

RESULTATS ET DISCUSSION

i) Production de biomasse et complément en NPK avec les engrais verts :

Le taux comparatif de croissance et de production de biomasse des deux cultures d'engrais verts intercalés est présenté dans le Tableau I. *T. purpurea* produit une biomasse plus importante (6,72 t/ha par récolte), avec une longueur / un poids moyens de racines de 34,2 cm / 4,8 g, que *S. aculeata* (biomasse 5,4 t/ha par récolte ; longueur / poids de la racine 14 cm / 1,2 g). Les deux cultures d'engrais verts sont efficaces pour améliorer la productivité du sol, probablement en raison de la production de biomasse et de la fixation de N₂ élevées et de la récupération des nitrates filtrés (Wortmann & Kaizzi, 2000). L'analyse chimique révèle que la teneur en azote s'avère plus élevée chez *T. purpurea* (3,4 %) que chez *S. aculeata* (3,14 %), ce que l'on attribue à la capacité de racinement profonde du premier, qui permet de rompre la couche dure du sous-sol et d'utiliser les nutriments disponibles en dessous de 30 cm de profondeur dans le sol. Les teneurs en P et en K s'avèrent plus élevées chez *S. aculeata* (0,41 % et 2,75 %) que chez *T. purpurea* (0,32 % et 2,4 %). L'avantage des légumineuses, comme cultures d'engrais verts recouvrants, est leur capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à leur relation symbiotique avec *Rhizobium* spp., en général associée avec le système racinaire de l'hôte comme les nodules. Le nombre et le poids de nodules s'avèrent être comparativement moins importants chez *T. purpurea* (4 et 0,2 g) que chez *S. aculeata* (7 et 0,6 g) (Tableau I).

ii) Influence des deux types d'engrais verts sur le rendement foliaire du mûrier :

L'effet du traitement sur le rendement foliaire du mûrier est présenté dans le Tableau I. Le rendement foliaire du mûrier chez la parcelle de mûrier cultivée avec *T. purpurea* s'avère plus élevé (10 460 kg / ha par récolte) qu'avec *S. aculeata* (9323 kg / ha / récolte) et la différence s'avère significative sur le plan statistique. L'étude comparative réalisée par Wortmann et Kaizzi (2000) a aussi rapporté que les rendements de la culture du maïs sont plus élevés chez les cultures recouvertes avec *T. purpurea* qu'avec *S. aculeata*. Hagedorn et coll., (1997) ont constaté que 25 % de l'azote de la plante (2,85 % du N) sont minéralisés dans les cinq premiers jours après l'incorporation dans la biomasse. L'amélioration de l'environnement physique et chimique, qui augmente le rendement foliaire chez le mûrier, pourrait être attribuée au taux rapide de minéralisation et à la capacité de racinement profonde de *T. purpurea* pour rompre la couche dure de sous-sol.

iii) Amélioration des propriétés physiques du sol :

Comparativement, la pénétration de la racine de mûrier et leur nombre sont plus élevés chez les parcelles cultivées avec *T. purpurea* qu'avec *S. aculeata* pour les différentes profondeurs du sol étudiées, sauf pour la couche supérieure du sol, c'est à dire 1-10 cm et les différences s'avèrent significatives sur le plan statistique (Tableau II). Cela indique clairement que la capacité de racinement importante et profonde de *T. purpurea* ameublisse ou ouvre la couche imperméable ou la couche dure de sous-sol, ce qui entraîne l'aération du sol et facilite la pénétration des racines de mûrier à une plus grande profondeur, en dessous de la couche dure de sous-sol. La formation d'une croûte à

la surface du sol et la présence d'une croûte dure de sous-sol sont des problèmes courants dans les sols semi-arides et arides.

Parmi les différentes propriétés physiques du sol, l'infiltration de l'eau détermine le potentiel de productivité du sol et est l'un des facteurs importants, qui contrôlent la production dans l'agriculture (Ramanathan et coll., 1983). Le taux d'infiltration diminue considérablement (Helalia et coll., 1988) à cause de la dispersion de l'argile, de l'obstruction des pores du sol ou du gonflement des cations monovalents.

La perturbation structurale de l'impact des gouttes de pluie et l'action de tri du flux de l'eau à la surface du sol diminuent aussi, dans une large mesure, l'infiltration des sols de cette nature. L'air emprisonné contribue aussi au taux d'infiltration de l'eau dans le sol (Suarez et coll., 1984). Le taux comparatif d'infiltration de l'eau dans le sol recueilli pour l'expérience avec la culture alternée de *S. aculeata* et de *T. purpurea* comme engrais verts chez le mûrier est présenté dans le Tableau III. Le taux d'infiltration de l'eau dans le sol est influencé par les deux types d'engrais verts qui varie significativement entre eux, en raison de l'action de racinement variable (Tableau II). Le taux d'infiltration de l'eau s'avère élevé chez les parcelles de mûrier cultivées avec *T. purpurea*, plus qu'avec *S. aculeata* et la différence s'avère être significative sur le plan statistique (Tableau III).

Les sols à 20-30 cm de profondeur, s'avèrent être des sols à maturité avec une texture moyenne à lourde et sont rouge brique avec un horizon argileux. La longueur des racines de *S. aculeata* s'avère être comprise entre 10 à 21 cm, avec une valeur moyenne de 13,9 cm (Tableau I), qui ne peut donc pas rompre la couche dure de sous-sol à 20-30cm de profondeur et le taux d'infiltration de l'eau s'avère aussi être faible dans cette couche (Tableau III). Les racines pivotantes profondes de l'engrais vert intercalé *T. purpurea* agissent comme un " labour biologique " pour pénétrer la croûte dure compacte du sous-sol et atteignent une profondeur de 40 à 50 cm et quand on les déracine elles apportent des effets d'ameublement du sol, semblables à un traitement de labour profond (Tableaux I et II). Le taux d'infiltration de l'eau à 31-40 cm chez les parcelles recouvertes avec les deux traitements est considéré comme rapide (Tableau III). Cela est dû à la texture sablonneuse caillouteuse et riche en terreau, que l'on trouve en dessous de la croûte dure du sous-sol.

CONCLUSION

La performance comparative des deux types d'engrais verts, c'est à dire, des légumineuses à racines peu profondes (*S. aculeata*) et à racines profondes (*T. purpurea*), étudiés pour améliorer les propriétés physico-chimiques du sol contenant des horizons argileux, à la surface comme croûtes et à la sous-surface comme croûte dure ou couche imperméable à une profondeur de 20-30cm, montre que *T. purpurea* produit une biomasse, un complément en azote significativement élevés à égalité avec *S. aculeata*, et de longues racines pivotantes qui pénètrent et abiment la croûte dure ou la couche imperméable du sous-sol. On observe le développement des racines de mûrier à plus de 30 cm de profondeur, avec une augmentation significative du rendement foliaire chez les parcelles de mûrier cultivées avec *T. purpurea*. On peut attribuer cela à l'ouverture de la couche dure ou de la couche imperméable de sous-sol, grâce au système racinaire profond de *T. purpurea*, qui entraîne de meilleures aération du sol et infiltration de l'eau et évite l'écoulement ou l'élimination des nutriments par la filtration, ce qui facilite la pénétration des racines de mûrier dans la couche plus profonde du sol et augmente l'efficacité d'utilisation des engrais / des nutriments, en dessous de la couche dure de sous-sol. Ceci représente donc un nouveau rapport sur l'utilisation de l'engrais vert *T. purpurea* chez le mûrier, que l'on recommande de cultiver alternativement avec *S. aculeata* pour rompre la couche dure de sous sol et améliorer les propriétés physicochimiques des sols à problèmes. Il est souhaitable que cette nouvelle technologie arrive jusqu'aux fermiers, pour permettre au système racinaire du mûrier d'atteindre une profondeur plus importante et pour améliorer et maintenir la productivité du mûrier.

IN VITRO MULTIPLE SHOOTS FROM NODAL EXPLANTS OF MATURE *RICINUS COMMUNIS*

ALKA SRIVASTAVA

In vitro culture and Plant Genetics Unit, Department of Botany, University of Lucknow, Lucknow U.P. 226 007, India.

Organogenic plant regeneration via callus induction was studied in eri silk food plant *Ricinus communis* from three explants of mature plants i.e. leaves, shoot tip and nodes, on media containing different combinations and concentrations of growth regulators. Different callusing media containing varying levels of 2,4-D, Kn, and IAA (0.5 to 2 mg/l) with or without BAP were tested for callus induction response. Maximum (85%) callusing response was obtained from leaf explants on medium supplemented with 1 mg/l IAA and 1 mg/l Kn. Shoots were formed on node and shoot tip explants in Kinetin alone and in Kinetin and IAA containing medium. Multiple shoots were obtained from nodes directly by axillary bud proliferation and also by adventitious bud formation after a callus phase. After 8 weeks of induction, the calluses were transferred on different regeneration media containing varying levels of BAP and Kinetin with or without IAA. Detailed analysis of the study revealed that callus from a medium with high callus induction frequency, did not show shoot induction.

Keywords: Eri silk, node, adventitious buds.

INTRODUCTION

Eri culture is an eco friendly endeavour utilising easily available resources and promises year round employment to people of all age groups. Eri silk is the product of the domesticated silkworm *Samia ricini* that feeds mainly on castor leaves. Consequently, *Ricinus communis*, a small soft wooded tree is receiving a lot of attention and is under surveillance for improvement and propagation of the elite types.

Ricinus communis, monotypic genus of family Euphorbiaceae is of great economic significance as the oil extracted from its seeds is used in pharmaceutical industry, paint industry, plastic industry and as lubricant. Its use as eri silkworm food plant has necessitated research on this plant with the twin objective of enhancement of variability for economically important traits and also propagation of the desired genotype. Hybridisation methods for improvement of castor have been largely unsuccessful in view of the strong incompatibility barriers (Reddy and Bir Bahadur, 1989) and application of tissue culture methods appears to have better potential for raising toxin free, disease and pest resistant or water and salt tolerant varieties.

Callusing from endosperm and response of seedling explants (Athma and Reddy, 1983; Reddy *et al* 1987) has been reported. The *in vitro* response of explants from mature castor trees was reported by Srivastava and Singh (1998). Keeping in mind the problems of micropropagation from seedling explants, organogenesis and regeneration from mature plants appears to be a necessity and the present investigation highlights the comparative response of shoot apex, leaf and node explants of mature eri silkworm food tree and the better adventitious bud proliferation and subsequent shooting potential of the node explants is reported here.

MATERIALS AND METHODS

Murashige and Skoog's (1962) medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% agar and various combinations of growth regulators were used for inducing regeneration in explants of *Ricinus communis* plants. Explants were surface sterilised prior to inoculation on to the media. They were sequentially rinsed with running water for 1 hr, Tween -80 for 15 minutes followed by distilled water till all traces of the biological detergent were removed. Sequential washing with 70% ethanol, and 0.05% HgCl₂, each followed by rinsing with water, was done. The explants were also subjected to a quick pulse treatment with 0.1% HgCl₂. This disinfected the explants but did not harm them. Shoot tips, nodes and leaves from mature plants were used as explants and the experiment was run in three replicates with the cultures maintained at 25°C in aseptic environment in the culture room.

RESULTS AND DISCUSSION

Various combinations of growth regulators were used in varying concentrations, but response was obtained in very limited combinations of growth regulators (Table I). Most of them promoted callusing from the explants, with the relative amount of callus invariably increasing with increase in the amount of Kn in the medium.

Increase in 2, 4-D concentration from 1 mg/l to 2mg/l gave a significant increase in percentage response. That for the node explants increased from 6.0 % at 1 mg/l to 30% at 1.5mg/l, to 70% at 2 mg/l and then decreased to 60% at 3mg/l 2,4-D, which was still higher than 1mg/l and 1.5 mg/l. The leaf explants gave 10% response at 1mg/l 2,4-D, but at 1.5 mg/l, 2 mg/l and 3mg/l 2,4-D the response was 50%, 80% and 70% respectively. Best percentage response was observed at 2 mg/l for both the node and leaf explants. The shoot tip explants also showed an increase in percentage response with increasing 2, 4-D concentration and maximum was at 3 mg/l 2,4-D.

Earliest response for nodes and shoot tip was obtained at 3 mg/l 2,4-D while the leaf explants responded first in both 2 mg/l and 3 mg/l 2,4-D. The amount of callus formed after 30 days was highest at 2 mg/l 2,4-D for all the explants. Though 3mg/l could initiate earliest response, growth rate was highest at 2 mg/l 2, 4-D.

When kinetin was used alone, early response was obtained for 2 mg/l for shoot tip and leaf explants and at 3 mg/l for node explants. The amount of callus formed was highest for leaf explants at 3 mg/l Kn. Shooting was, however, obtained at 1 mg/l Kn for node explants and at 2 mg/l Kn for shoot explants.

In BAP containing medium, leaf explants responded simultaneously at the three concentrations used while node explants gave earliest response at 0.5 mg/l BAP and shoot tip explants at 1.5 mg/l BAP. Percentage response of leaf and node explants was highest at 1.5 mg/l BAP and for shoot tips response was highest at 1 mg/l BAP. Maximum callus was also formed at 1 mg/l of BAP.

Percentage response of shoot tip explants was highest at 1.5 mg/l IAA while node and leaf explants gave maximum response at 1mg/l and 2 mg/l IAA respectively. Leaf explants responded in 6 days at 1 mg/l IAA, node explants in 7 days in 0.2 and 0.5 mg/l IAA and shoot explants also after 7 days in 0.5 and 1 mg/l IAA. The amount of callus formed in IAA containing medium was high, almost similar in amount to that formed in 2, 4-D.

When IAA and kinetin were used together in the medium, the response was early and the amount of callus was more in some combinations. Maximum callus was formed in 1.0 mg/l IAA and 1.5 mg/l Kinetin and in 1 mg/l of both. In IAA Kinetin containing medium, shoot tip explants responded first in the lowest concentration of the two (0.2 mg/l IAA and 0.5 mg/l Kn) but gave maximum response at 1 mg/l of both the growth regulators. The node explants responded first in 0.5 mg/l of both IAA and Kn while the leaf explants gave earliest response at higher concentrations of the two i. e. 1 mg/l IAA with 1.5 mg/l Kn and 1.5 mg/l IAA with 2 mg/l Kn. Nodes and leaves gave maximum response at 1 mg/l of both IAA and Kn. The shoot tip explants produced shoots in 0.5 mg/l each of IAA and

Kinetin while the node explants produced multiple shoots (3-5) in 1 mg/l to 1.5 mg/l IAA with 1.5 mg/l to 2 mg/l Kinetin.

Table I. Response of different explants of mature eri food plant *Ricinus communis* on Murashige and Skoog's medium fortified with different growth regulators.

Tableau I. Réponse de différents explants de la plante hôte de l'eri Ricinus communis sur du milieu de Murashige et Skoog fortifié avec différents régulateurs de croissance.

Growth regulators mg/l	Percentage response % de réponse			Days to response Nbre de jours avant la réponse			Type of response Type de réponse		
	Shoot apex	Node	Leaf	Shoot apex	Node	Leaf	Shoot apex	Node	Leaf
<i>Régulateurs de croissance mg/l</i>	<i>Sommet de la pousse</i>	<i>Noeud</i>	<i>Feuille</i>	<i>Sommet de la pousse</i>	<i>Noeud</i>	<i>Feuille</i>	<i>Sommet de la pousse</i>	<i>Noeud</i>	<i>Feuille</i>
2,4-D									
1	20	06	10	10	-	10	C+	-	C+
1.5	40	30	50	9	10	8	C+	C+	C++
2	40	70	80	9	10	7	C+++	C++++	C+++
3	50	60	70	8	9	7	C+	C+	C++
Kn									
1	50	40	60	10	10	10	C+	C+,S	C+
2	60	60	70	7	10	8	C+, S	C+	C++
3	60	30	70	8	8	9	C++	C++	C+++
IAA									
.2	40	30	40	8	7	8	C+	C+	C+
.5	50	30	40	7	7	8	C+	C+	C+
1	50	65	70	7	8	6	C++	C++	C+++
1.5	70	40	70	8	8	7	C++	C+++	C+++
2	60	40	80	8	10	7	C+	C++	C++
BAP									
.5	60	10	40	10	8	8	C+	C+	C++
1	60	25	60	10	10	8	C+	C++	C+
1.5	40	40	65	7	10	8	C+	C+	C++
IAA Kn									
.2 .5	50	40	70	7	10	9	C++	C+	C+
.5 .5	50	40	70	8	7	8	C++, S	C++++	C+
1 1	70	65	85	8	7	8	C+	C++++	C++++
1 1.5	40	80	80	9	8	7	C+	C++, MS	C++++
1.5 2	20	70	80	9	8	7	C+	C+, MS	C++

(S = 1 shoot/culture / 1 pousse / culture, MS= multiple shoots / Pousses multiples,

C+ = Callus initiation / Début de cal.

C++ = Moderate callus / Cal modéré.

C+++ = Good callus / Bon cals. C++++ = Profuse callus / Cals abondants.

After 8 weeks of induction, the callus on different growth regulators was transferred to regeneration media containing varying amounts of BAP and kinetin, with and without IAA. The study revealed that the callus from leaf and shoot tip explants, taken from a medium with high callus induction frequency did not show shoot induction. The subcultured callus proliferated cells further leading to increase in its mass but did not show organogenesis of any kind.

Adventitious bud formation took place on callus from nodal explants and multiple shoots were formed consequently. The shoots were 3–4 cm. long, green and healthy. They could be subcultured and grown separately in the same medium. Efforts to induce rooting on these regenerated shoots are underway and success has been obtained in NAA containing MS medium.

Laskar *et al.*, (2005) reported a method for adventitious shoot bud regeneration from leaves of field plants of *Potentilla fulgens*. The most effective medium for growth was modified MS with 0.1 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA, in which 80% bud induction frequency was observed. Gangaprasad *et al.*, (2005) cultured single nodes from young top shoots of *Decalepis arayalpathra* on Murashige and Skoog's (MS) agar medium supplemented with 0.1 to 5.0 mg l⁻¹ BAP. All the concentrations of BAP induced single axillary shoot of varying length. However, MS medium supplemented with 1.0 mg l⁻¹ BAP supported rapid growth and produced the longest shoots (6.8 cm) in 60 days.

The findings are important as they speculate a method of propagation of elite castor plant established on the basis of maturity parameters, ranging from habit and morphology to endogenous ricin content. Efforts are being made to develop very low toxin (VLT) castor cultivars using multipronged methods based on both conventional and modern techniques (Auld *et al.*, 2001). Besides, *in vitro* work in castor has been mostly from seedling explants and since it is well established that the culture requirements of seedling and mature plant explants differ considerably, emphasis needs to be laid on the use of mature castor explants. Callusing from endosperm and response of only seedling explants (Athma and Reddy, 1983; Reddy *et al.*, 1987) has been reported. Our earlier efforts (Srivastava and Singh, 1998) using mature tree explants produced callus. However, now we have been able to induce caulogenesis and efforts to induce rooting are underway, which will be followed by gradual acclimatisation.

REFERENCES

- AULD D.L., ROLFE RD & McKEON T.A. (2001) Journal of New Seeds: Innovations in production, biotechnology, quality, and marketing Volume: 3 Issue: 3 61-69
- GANGAPRASAD A., WILLIAM DECRUSE S., SEENI S. & NAIR G.M. (2005) Micropropagation and ecorestoration of *Decalepis arayalpathra* (Joseph & Chandra.) Venter—An endemic and endangered ethnomedicinal plant of Western Ghats Indian Journal of Biotechnology Vol. 4, 265-270
- LASKAR M. A., LINGDOH J.P., BUAM J.J. & SYIEM D. (2005) Plantlet regeneration via adventitious shoot bud proliferation from leaf explants in *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook.—A plant possessing hypoglycemic activity Indian Journal of Biotechnology Vol. 4, 257-260
- MURASHIGE T. & SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture Physiol Plant 15: 473-497
- PRASANNA A. & REDDY T.P. (1983) Efficiency of callus initiation and direct regeneration from different explants of castor *Ricinus communis* L. Curr. Sci. 52(6): 256-257
- REDDY K.R.K. & BIR BAHADUR (1989) Adventitious bud formation from leaf cultures of castor (*Ricinus communis*) Curr. Sci. 58 (3): 350
- REDDY K.R.K., RAO G. P. & BIR BAHADUR (1987) *In vitro* morphogenesis from seedling explants and callus cultures of castor Phytomorphology 37(4):337-340
- SRIVASTAVA ALKA & SINGH K. (1998) Investigations on *in vitro* response in castor Pers. In Cytol and Ge

OBTENTION DE POUSSES MULTIPLES *IN VITRO* A PARTIR D'EXPLANTS NODAUX DE *RICINUS COMMUNIS*

ALKA SRIVASTAVA

In vitro culture and Plant Genetics Unit, Department of Botany, University of Luknow, Lucknow
U. P. 226 007, Inde.

*On a étudié la régénération organogénique de plants par l'induction de cal chez la plante hôte du ver à soie eri **Ricinus communis** à partir de trois explants de plants mûrs, c'est à dire, les feuilles, l'extrémité de la pousse et les nœuds sur des milieux contenant différentes combinaisons et concentrations de régulateurs de croissance. On a testé les différents milieux contenant des niveaux variés de 2,4-D, de Kn et d'IAA (0,5 à 2 mg / l) avec ou sans BAP par rapport à la réponse d'induction de cal. On obtient une réponse maximum de formation de cals (85 %) avec des explants de feuilles sur un milieu additionné avec 1 mg / l d'IAA et 1 mg / l de Kn. Des pousses se forment sur les explants de nœuds et d'extrémités de pousses dans un milieu contenant de la kinétine seule et dans un milieu contenant de la kinétine et de l'IAA. On obtient des pousses multiples à partir de nœuds directement par la prolifération du bourgeon axillaire et aussi par la formation de bourgeons adventifs après une phase de cal. Après 8 semaines d'induction, on transfère les cals sur différents milieux de régénération contenant des niveaux variés de BAP et de kinétine avec ou sans IAA. L'analyse détaillée réalisée dans l'étude montre que le cal provenant d'un milieu donnant une fréquence élevée d'induction de cal, ne présente pas d'induction de pousse.*

INTRODUCTION

L'élevage de l'eri est une activité qui ne nuit pas à l'environnement, qui utilise des ressources facilement disponibles et qui apporte un emploi tout au long de l'année à des personnes de tous les groupes d'âges. La soie eri est le produit du ver à soie domestiqué, *Samia ricini*, qui se nourrit principalement de feuilles de ricin. Par conséquent, *Ricinus communis*, un arbuste au bois tendre est l'objet de beaucoup d'attention et d'études dans le but de l'améliorer et de multiplier des types supérieurs.

Ricinus communis, un genre monotypique de la famille des Euphorbiaceae est très important sur le plan économique, puisque l'huile extraite de ses graines est utilisée dans l'industrie pharmaceutique, dans l'industrie de la peinture, dans l'industrie du plastique et comme lubrifiant. Son utilisation comme plante hôte du ver à soie eri a entraîné des recherches sur cette plante dans le double objectif d'améliorer la variabilité des caractères économiques importants et aussi de multiplier les génotypes désirés. Les méthodes d'hybridation pour l'amélioration du ricin ont rencontré très peu de succès en raison de fortes barrières d'incompatibilité (Reddy et Bir Bahadur, 1989) et le recours à des méthodes de culture des tissus semble présenter le meilleur potentiel pour mettre au point des variétés sans toxine, résistant aux maladies et aux parasites et tolérant l'eau et le sel.

Des rapports ont été publiés sur la formation de cals à partir d'endospermes et sur la réponse des explants de plantules (Athma et Reddy, 1983 ; Reddy et coll., 1987). Srivastava et Singh (1998) ont rapporté la réponse *in vitro* d'explants d'arbustes de ricin à maturité. Tout en gardant à l'esprit les problèmes liés à la micromultiplication à partir d'explants de plantes, l'organogénèse et la régénération à partir de plants mûrs semble être nécessaire et cette étude met en évidence la réponse

comparative d'explants du sommet de la pousse, de la feuille et du nœud d'arbustes hôtes du ver à soie eri mûrs et nous constatons ici que la prolifération des bourgeons adventifs et le potentiel de pousse ultérieur sont meilleurs avec des explants de nœuds.

MATERIELS ET METHODES

On utilise du milieu de Murashige et Skoog (1962) additionné avec 3 % de saccharose, 0,7 % d'agar et des combinaisons variées de régulateurs de croissance pour induire la régénération de plants de *Ricinus communis*. On stérilise la surface des explants avant l'inoculation sur les milieux. On les rince successivement avec de l'eau du robinet pendant 1 heure, du Tween-80 pendant 15 minutes puis avec de l'eau distillée jusqu'à ce que toutes les traces de détergent biologique soient éliminées. On les lave successivement avec 70 % d'éthanol et 0,05 % d' HgCl_2 , et on les rince ensuite à l'eau. On soumet les explants à un traitement pulsé rapide avec 0,1 % d' HgCl_2 . Cela désinfecte les explants mais ne les abîme pas. On utilise les extrémités, les nœuds et les feuilles de pousses de plants à maturité comme explants et on procède à l'expérience en trois répétitions avec des cultures maintenues à 25° C, dans un environnement aseptique dans la pièce de culture.

RESULTATS ET DISCUSSION

On utilise différentes combinaisons de régulateurs de croissance à des concentrations variables, mais on obtient une réponse avec des combinaisons très limitées de régulateurs de croissance (Tableau I). La plupart d'entre eux favorisent la formation de cals à partir des explants, et la quantité relative de cal augmente invariablement avec l'augmentation de la quantité de Kn dans le milieu.

L'augmentation de la concentration de 2,4-D de 1 mg / l à 2 mg / l entraîne une augmentation significative de la réponse. Celle des explants de nœud passe de 6 % avec 1 mg / l à 30 % avec 1,5 mg / l, à 70 % avec 2 mg / l et puis baisse à 60 % avec 3 mg / l de 2,4-D, ce qui est toujours plus qu'avec 1 mg / l et 1,5 mg / l. Les explants de feuille donnent une réponse de 10 % avec 1 mg / l de 2,4-D mais avec 1,5 mg / l ; 2 mg / l et 3 mg / l de 2,4-D la réponse est respectivement de 50 % ; 80 % et 70 %. On observe le meilleur pourcentage de réponse avec 2 mg / l à la fois pour les explants de nœud et de feuille. Les explants d'extrémités de pousses présentent aussi une augmentation du pourcentage de réponse avec l'augmentation de la concentration de 2,4-D et on obtient le maximum avec 3 mg / l de 2,4-D.

On obtient la réponse la plus rapide pour les nœuds et les extrémités de pousses avec 3 mg / l de 2,4-D tandis que les explants de feuilles répondent le plus rapidement à la fois dans 2 mg / l et 3 mg / l de 2,4-D. La quantité de cals qui se forment au bout de 30 jours est la plus élevée avec 2 mg / l de 2,4-D pour tous les explants. Bien que 3 mg / l puisse amorcer une réponse plus précoce, le taux de croissance est le plus élevé avec 2 mg / l de 2,4-D.

Quand on utilise de la kinétine seule, on obtient une réponse rapide avec 2 mg / l pour les explants d'extrémités de pousses et de feuilles et avec 3 mg / l pour les explants de nœud. La quantité de cals qui se forment est plus élevée pour les explants de feuilles avec 3 mg / l de Kn. Cependant, on obtient une formation de pousses avec 1 mg / l de Kn pour les explants de nœud et avec 2 mg / l de Kn pour les explants de pousses.

Dans le milieu contenant du BAP, les explants de feuilles répondent à la même vitesse avec les trois concentrations utilisées tandis que les explants de nœud donnent la réponse la plus rapide avec 0,5 mg / l de BAP et les explants d'extrémités de pousses avec 1,5 mg / l de BAP. Le pourcentage de réponse des explants de feuilles et de nœuds est le plus élevé avec 1,5 mg / l de BAP et pour les extrémités de pousses, la réponse est la plus élevée avec 1 mg / l de BAP. Un maximum de cals se forme aussi avec 1 mg / l de BAP.

Le pourcentage de réponse des explants d'extrémités de pousses est le plus élevé avec 1,5 mg / l d'IAA tandis que les explants de nœuds et de feuilles donnent la réponse maximum avec

respectivement 1 mg / l et 2 mg / l d'IAA. Les explants de feuilles répondent en 6 jours avec 1 mg / l d'IAA, les explants de nœud en 7 jours dans 0,2 et 0,5 mg / l d'IAA et les explants de pousses aussi au bout de 7 jours dans 0,5 et 1 mg / l d'IAA. La quantité de cals qui se forment dans un milieu contenant de l'IAA est élevée, presque autant que celle qui se forme avec du 2,4-D.

Quand on utilise de l'IAA et de la kinétine ensemble dans le milieu, la réponse est rapide et la quantité de cals est plus importante avec certaines combinaisons. Le maximum de cals se forme dans 1 mg / l d'IAA et 1,5 mg / l de kinétine et dans 1 mg / l des deux. Dans un milieu contenant de l'IAA et de la kinétine, les explants d'extrémités de pousses répondent en premier à la plus faible concentration des deux (0,2 mg / l d'IAA et 0,5 mg / l de Kn) mais donnent la réponse maximum avec 1 mg / l des deux régulateurs de croissance. Les explants de nœud répondent en premier dans 0,5 mg / l à la fois d'IAA et de Kn tandis que les explants de feuilles donnent la réponse la plus rapide aux concentrations les plus élevées des deux, c'est à dire 1 mg / l d'IAA combiné à 1,5 mg / l de Kn et 1,5 mg / l d'IAA avec 2 mg / l de Kn. Les nœuds et les feuilles donnent la réponse maximum avec 1 mg / l à la fois d'IAA et de Kn. Les explants d'extrémités de pousses donnent des pousses dans 0,5 mg / l à la fois d'IAA et de kinétine tandis que les explants de nœud donnent des pousses multiples (3 à 5) dans 1 mg / l à 1,5 mg / l d'IAA et dans 1,5 mg / l à 2 mg / l de kinétine.

Au bout de 8 semaines d'induction, on transfère les cals sur différents régulateurs de croissance dans des milieux de régénération contenant des quantités variées de BAP et de kinétine, avec et sans IAA. L'étude révèle que le cal obtenu à partir d'explants de feuilles et d'extrémités de pousses, prélevé sur un milieu avec une fréquence d'induction de cal élevée, n'entraîne pas d'induction de pousses. Le cal mis en sous-culture entraîne la prolifération de cellules, ce qui entraîne par la suite l'augmentation de sa masse mais n'entraîne aucune organogénèse d'aucun type.

La formation de bourgeons adventifs a lieu sur le cal d'explants nodaux par la suite et des pousses multiples se forment. Les pousses font 3 à 4 cm de long, sont vertes et saines. Elles peuvent être mises en sous-culture et cultivées séparément dans le même milieu. Des efforts ont été entrepris pour induire le racinement sur ces pousses régénérées et ils ont été couronnés de succès dans un milieu MS contenant du NAA.

Laskar et coll., (2005) ont rapporté une méthode pour la régénération de bourgeons adventifs de pousses provenant de feuilles de plants de *Potentilla fulgens* cultivés sur le terrain. Le milieu de croissance le plus efficace est le MS modifié avec 0,1 mg / l de BAP et 0,1 mg / l de NAA, dans lequel on observe une fréquence d'induction de bourgeons de 80 %. Gangaprasad et coll., (2005) ont cultivé des nœuds uniques provenant de jeunes pousses sommitales de *Decalepis arayalpathra* sur du milieu agar de Murashige et Skogg (MS) additionné avec 0,1 à 5,0 mg l⁻¹ de BAP. Toutes les concentrations de BAP induisent une pousse axillaire unique de longueur variée. Cependant, le milieu MS additionné avec 1,0 mg l⁻¹ de BAP entraîne une croissance rapide et donne les pousses les plus longues (6,8 cm) en 60 jours.

Ces observations sont importantes puisqu'elles apportent une méthode de multiplication de plants de ricin supérieurs établie sur la base de paramètres de maturité, allant de la morphologie à la teneur endogène en ricin. Des efforts sont en cours pour mettre au point des cultivars de ricin avec très peu de toxine (VLT) en utilisant des méthodes en plusieurs parties, basées à la fois sur des techniques conventionnelles et modernes (Auld et coll., 2001). Par ailleurs, les travaux *in vitro* chez le ricin ont été principalement réalisés à partir d'explants de plantules et puisqu'il est clair que les besoins culturels des explants de plantules et de plants mûrs diffèrent considérablement, il faut mettre l'accent sur l'utilisation d'explants mûrs de ricin. Des rapports ont été publiés sur la formation de cals à partir d'endospermes et on a obtenu une réponse uniquement avec des explants de plantules (Athma et Reddy, 1983 ; Reddy et coll., 1987). Nos tentatives précédentes (Srivastava et Singh, 1998) en utilisant des explants d'arbres mûrs ont donné des cals. Cependant, à présent, nous avons été capables d'induire une morphogénèse et nous nous efforçons d'induire le racinement, qui sera suivi par une acclimatation progressive.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

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

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

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

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

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

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

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

- Remerciements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

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

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

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

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

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

- Acknowledgements.

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

