

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY

Managing Director
Chief Editor

COMITE DE REDACTION ***EDITORIAL BOARD***

ALMEIDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
CAPPELLOZZA S. (Italie / *Italy*)
CHEN Y. (Chine / *China*)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
GUO X. (Chine / *China*)
HE K. (Chine / *China*)
IATROU K. (Grèce / *Greece*)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
KUSAKABE T. (Japon / *Japan*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
MACHII H. (Japon / *Japan*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MASE K. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
MIRANDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TAKEDA S. (Japon / *Japan*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Allemagne / *Germany*)
TZENOV P. (Bulgarie / *Bulgaria*)
VAGO C. (France)
XIA Q. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YUNGEN M. (Chine / *China*)

SOMMAIRE - CONTENTS

Revue / Review

- Systemic diseases of mulberry – a review** 327
 Revue sur les maladies systémiques du mûrier 341
 D. D. SHARMA, N. B. CHOWDARY, V. NISHITA NAIK & MALA V. R.

Article scientifique / Scientific paper

- Fenoxycarb administration and their effects on biology of Brazilian silkworm strains** 349
 Administration de fénoxycarbe et effets sur la biologie des souches de vers à soie brésiliens 359
 J. E. MIRANDA, S. A. DE BORTOLI & R. TAKAHASHI

Rapports techniques / Technical reports

- Cytoplasmic polyhedrosis virus infecting the oak tasar silkworm, *Antheraea proylei* Jolly (Lepidoptera: Saturniidae)** 365
 Virus de la polyédrose cytoplasmique infestant le ver à soie tasar du chêne, *Antheraea proylei* Jolly (Lepidoptera : Saturniidae) 375
 L. REETA, T. JAMES KEISA, K. CHAOBA SINGH & R. VARATHARAJAN

- Influence of temperature and humidity maintained during cocoon spinning on reeling performance and quality of raw silk of Indian bivoltine hybrid cocoons** . . . 379
 Influence de la température et de l'humidité maintenues pendant le filage du cocon sur la performance de dévidage et la qualité de la soie grège chez les cocons hybrides bivoltins indiens 391
 SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR

- Genetic divergence analysis in mulberry** 399
 Analyse de la divergence génétique chez le mûrier 407
 H. V. VENKATESHAIAH, R. S. MALLIKARJUNAPPA, M. S. ESWAR RAO,
 U. D. BONGALE & M. N. ANANTHARAMAN

- In vitro* flowering and fruiting in the cultures of *Morus indica* Var. Mysore Local** . . 411
 Floraison et fructification *in vitro* de cultures de la variété Mysore locale de *Morus indica* 419
 D. H. TEJAVATHI, M. P. SHREE, B. PUSHPAVATHI & SAVITHA M. MURTHY

- Callus induction and efficient regeneration through organogenesis from foliar explants in different species of mulberry** 423
 Induction de cals et régénération efficace par l'organogenèse d'explants foliaires chez différentes espèces de mûrier 429
 B. N. SUSHEELAMMA, M. K. PRITHVIRAJE URS, C. K. KAMBLE
 & R. BALAKRISHNA

Studies on water requirement and water use efficiency at different methods and levels of irrigation in mulberry	433
Etudes sur le besoin en eau et sur l'efficacité d'utilisation de l'eau avec différentes méthodes et niveaux d'irrigation chez le mûrier	441
N. SIDDALINGASWAMY, U. D. BONGALE, A. G. BANDI, S. N. NARAYANGOWDA & R. M. SHIVAPRAKASH	
A study on the comparative performance of micro irrigation systems with furrow method in mulberry cultivation	447
Etude sur la performance comparative entre les systèmes de micro irrigation et la méthode des sillons dans la culture du mûrier	453
N. SIDDALINGASWAMY, U. D. BONGALE, S. N. NARAYANAGOWDA, R. M. SHIVAPRAKASH & M. N. ANANTHARAMAN	

SYSTEMIC DISEASES OF MULBERRY – A REVIEW

D. D. SHARMA, N. B. CHOWDARY, V. NISHITHA NAIK & V. R. MALA

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

Mulberry (Morus spp.) the sole food source of silkworm (Bombyx mori L.) is affected by many diseases such as foliar, soilborne and systemic. Among these, the systemic diseases are the most dangerous ones spreading internally throughout the plant system caused by pathogens viz., Mycoplasma Like Organisms (MLO) or mycoplasma, virus, viroid, Fastidious Xylem Inhabiting Bacterium (FXIB) and spiroplasma. The systemic diseases are reported from sericultural countries all over the world. The various diseases caused by these pathogens are mulberry dwarf, mosaic, ring spot, yellow net vein, yellow streak, latent virus, mosaic dwarf, leaf scorch, crinkle mosaic, etc. Appropriate and timely preventive measures are needed to avoid the epidemic of such diseases for qualitative and quantitative leaf production in mulberry. The various systemic diseases of mulberry are reviewed in this paper.

Keywords: Systemic diseases, mulberry, symptomatology, fastidious xylem inhabiting bacterium, mycoplasma, virus, viroid.

INTRODUCTION

The systemic diseases are also called “vector borne diseases” as they are transmitted through the vectors like insects and nematodes. Generally, the systemic diseases are caused by pathogens such as Mycoplasma Like Organisms (MLO) or mycoplasma, virus, viroid, Fastidious Xylem Inhabiting Bacterium (FXIB) and spiroplasma. The systemic diseases are a serious problem in countries like Japan and China. In India, though these diseases are sporadic in nature, once mulberry is infected, it can result in repeated damage reducing the leaf yield and quality. Not only systemic diseases do reduce the leaf yield to an extent of 15-20 % (Kumar, 1991; Minamizawa, 1997; Ertian, 2003) but also deteriorate the leaf quality especially protein, which is the main source for silkworm to synthesize the silk (Fukuda *et al.*, 1959; Takeuchi, 1960). Though reviews on foliar and soilborne diseases of mulberry are available (Govindaiah and Sharma, 1994; Philip *et al.*, 1994; Teotia and Sen, 1994; Maji and Qadri, 1999; Sharma *et al.*, 2003; Ramakrishnan and Senthilkumar, 2003; Sharma, 2004; Sharma *et al.*, 2005), efforts have not been made on systemic diseases to review the available information so far. Hence, the present review is therefore, to update the information available on systemic diseases in mulberry.

(I). MYCOPLASMA DISEASE

Mycoplasmas are small parasitic organisms that are known to cause disease in plants. These organisms produce spherical to ellipsoid shaped bodies smaller than bacteria, but larger than the virus particles. Mycoplasmas live in phloem tissue of plants containing protein, DNA, RNA and enzymes. The elementary bodies of mycoplasma vary in shape and size. Many plant diseases, earlier thought to be caused by viruses, are reported to be caused by mycoplasma. They are sensitive to heat and some antibiotics (Ishijima and Ishiie, 1981). In mulberry, mycoplasma like organism causes the dwarf disease.

Mulberry dwarf:

In mulberry, the disease is first reported from Japan (Doi *et al.*, 1967) and due to its wide occurrence, it is considered as one of the most destructive disease in Japan (Takahashi, 1975; Minamizawa, 1997), China (Ertian, 2003) and Korea (La, 1987). In Japan, the area damaged by the dwarf disease was reported to be about 12 % of the total area of mulberry under cultivation during 1916 (Ishijima and Ishiie, 1981). In China, the disease is called as mulberry yellow dwarf/ wasting disease/ hunch backed / cat's ear and the rate of infection in branches is very high (50-80 %) with leaf yield loss up to 70 % (Zheng *et al.*, 1988; Ertian, 2003). The disease occurs throughout the year, but heavy incidence is noticed during May-September in Jiangsu and Zhejiang provinces of China. The disease is caused by Mycoplasma like organism (MLO) and transmitted by vectors like *Hishimonus sellatus* Uhler (green head leafhopper) and *Hishimonoides sellatiformis* Ishihara (red head leafhopper) (Tahama, 1975; Minamizawa, 1997; Ertian, 2003). Two genetically distinct strains of MLOs have been reported to cause mulberry dwarf disease viz., *Tamana* and *Kikuchi*, the former causing severe infection in mulberry and later mild infection (Tahama, 1967; Kawakita, 1977; Ishijima and Ishiie, 1981). Though the occurrence of mulberry dwarf disease has not been reported in India, its outbreak cannot be overlooked due to intensive mulberry cultivation in the non traditional areas of the country (Gupta, 2001; 2005).

Disease symptoms and nature of damage:

The symptom of the disease appears as curling of the apical leaf at initial stage. Later, the leaves of affected plant reduce in size, veins become thin and transparent. The leaf lamina becomes shorter bending downwards with severe wrinkling of the surface. Axillary buds sprout earlier than normal ones, internodes and lateral branches become shorter resulting in witches' broom appearance (Fig. 1).



Fig. 1. Mulberry Dwarf.

Fig. 1. Nanisme du mûrier.

The conducting tissues of mulberry plants are badly affected by the infection of the disease resulting in many physiological disorders like weak transpiration and retention of assimilatory starch in the mesophyll of leaves due to non-translocation through petioles (Ishijima and Ishiie, 1981). Further, it has been reported that the crude lipid and crude fibres are extremely low in diseased leaves whereas assimilatory starch and sugar contents are higher than in healthy leaves (Zheng *et al.*, 1988). In the advanced stage of infection, the plants become extremely stunted, lose vitality and die within 2-3 years (La 1987; Ishijima and Ishiie, 1981; Minamizawa, 1997; Ertian, 2003).

The pathogens of mulberry dwarf disease (MLOs) were successfully isolated by stylectomy (cutting of insect stylets by Yttrium Aluminum Garnet (YAG) laser method) using a homopterous insect, *Ricania japonica*. The MLOs were detected in the phloem sap collected from diseased mulberry plants as fluorescent particles stained with 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) under a fluorescence microscope but were absent in the sap of healthy mulberry plants. The presence of MLOs in the phloem sap was also confirmed by electron microscopy (Kawakita and Katsuhara, 1993).

Disease cycle:

The disease is systemic spreading preliminarily through vectors (*H. sellatus* and *H. sellatiformis*) and secondary infection is by plantation of diseased scions/ cuttings/ saplings. The MLO causing mulberry dwarf, is restricted mainly to sieve tubes and the adjacent phloem parenchyma passing through sieve pores and plasmodesmata of phloem cells. More MLO bodies are found in young stems, leaves and roots of mulberry plants and less in older tissues. They are either spherical or ellipsoidal, ranging from 50 to 800 nm in diameter, bounded by a double-layered unit membrane of about 8 nm in thickness, and contain ribosomes and nuclear net strands (Ishijima and Ishiie, 1981; Kawakita and Katsuhara, 1993; Ertian, 2003). Four generations of both the vectors are found annually. 1st and IVth generations of green head leafhopper (*H. sellatus*) and all the four generations of red head leafhopper (*H. sellatiformis*) are reported to transmit the pathogen in mulberry (Minamizawa, 1997; Ertian, 2003). The minimum acquisition-feeding period for the vectors is 3 hours. The mulberry dwarf mycoplasma hibernates in plant tissues during unfavourable conditions and causes disease symptoms during favourable conditions (20-25 °C). The disease severity is directly related to the number of mycoplasmas detected in the diseased tissues. Once acquired, the leafhoppers retain mulberry dwarf mycoplasma infectivity until their death (Kawakita and Ishiie, 1970; Ishijima, 1971; Tahama, 1975; Kawakita, 1977; Minamizawa, 1997; Ertian, 2003).

Management of mycoplasma disease:

Physical/cultural methods:

These include mechanical control, thermotherapy, agronomical practices and host resistance (Govindaiah and Sharma, 1993; Lim *et al.*, 1994; Minamizawa, 1997; Ertian, 2003).

- Disease-free material should be selected for plantation.
- Diseased plants should be removed and destroyed immediately.
- Strict quarantine measures should be followed.
- Infection from mulberry scions/cuttings can be eliminated by dipping them in hot water for 15 to 20 minutes at 50° C or from 2 to 5 minutes at 55° C.
- Infection from diseased saplings can be eliminated by dipping the root system in hot water for 15 minutes at 50° C or 30 minutes at 45° C before planting.
- Pruning of plants should be at higher level and over-harvesting of leaves should be avoided between spring and summer seasons.

Chemical methods:

Chemical methods of disease control include spraying of antibiotics for the control of pathogen and extermination of vectors through chemicals (Ishiie *et al.*, 1967; 1971; Takahashi, 1975; Ertian, 2003).

- For the control of pathogen:

Foliar spray of 100 ppm solution of tetracycline hydrochloride (TC-HCl) at an interval of 2 to 3 days after summer pruning suppresses the symptom development for only a short duration.

- For the control of vectors:

Phenthoate, Trichlorfon, Vamidothion, Allyxycarb, Calvinphos or Propoxur can be sprayed (1000-fold dilution) or dusted at the rate of 3-5 kg/ha twice, at sprouting stage and after leaf development for extermination of leafhopper.

- Foliar spray of DDVP (Dichlorvos) is recommended to kill the vectors and other harmful insects.

Host Resistance:

Several hybrids of Kataturi, Russkaya, Mitskheturi, Gibird-2, Gruzniish-4, Oshima, Yu-2, Husang-7, Xiao Baitiao and Xiang-456 are reported to have resistance against mulberry dwarf disease (Wu *et al.*, 1992; Biswas and Sengupta, 1994; Lei *et al.*, 1997; Kuai *et al.*, 1997). Murakami (1973) reported that in mulberry the disease resistance against mycoplasma is heritable. Resistant varieties such as Kataturi × Gruzniish-4, Lu × Gruzniish-5 and PS-9 × Tbilisuri can be planted in disease prone areas.

(II). VIRAL AND VIROID DISEASES

Viruses are sub microscopic particles infecting host cells and usually consist of nucleic acids and proteins. Plant viruses have different shapes and sizes. They are elongated (rigid rods or flexuous threads), spherical (isometric or polyhedral) and cylindrical. The elongated virus is rod shaped measuring 46 to 300 nm in length and 18 to 22 nm in width while flexuous threads are 470 to 2000 nm long and 8 to 13 nm wide. Viroids associated with certain plant diseases are low molecular weight nucleic acids containing RNA only. They are similar to viruses, lacking protein encapsulation and spreading through implements and mechanical devices (Zhang, 1983; Flores *et al.*, 2005).

There are several reports on devastation of many crops *viz.*, sandal, coconut, banana, apple, citrus, grapevine, *etc.* by viruses (Rangaswami and Mahadevan, 1999). The viral diseases of mulberry are more prevalent in countries like China, Japan, Korea, Sri Lanka, Thailand, *etc.* In India the incidence of viral diseases are sporadic (Gupta, 2005). In China, viroid has also been reported to cause mosaic dwarf disease (Zhang, 1983). In India, for the first time Raychaudhuri *et al.* (1961) have reported the occurrence of viral diseases in mulberry from West Bengal. Subsequently, the sporadic incidence of viral diseases in mulberry has been reported from different parts of the country (Raychaudhuri *et al.*, 1962; Koul *et al.*, 1991; Gupta, 2001; Chowdary *et al.*, 2005).

Mulberry Mosaic:

Mosaic disease is very common in China, Thailand and India. The virus causing mosaic disease in China is reported to be a filamentous particle of 400-1000 nm length and 12-16 nm width (Chen, 1995). The disease spreads primarily through the infected plants. The transmission of the disease takes place by insect vectors (*Rhopalosiphum maidis* Fitch., *Myzus persicae* Sulz. and *Aphis gossypii* Glov.), grafting and sap inoculation (Raychaudhuri *et al.*, 1965; Sengupta *et al.*, 1990). Viral infected mulberry plants have the characteristic symptoms like vein-clearing followed by dark and light green mosaic pattern on leaves (Fig. 2). On severity, the leaves become deformed, distorted and twined resulting in stunted plant growth (Raychaudhuri *et al.*, 1962; Srisomchai and Brown, 1971; Chen, 1984; Kumar, 1991; Gupta, 1999; 2005).



Fig. 2. Mulberry Mosaic.

Fig. 2. Mosaïque du mûrier.

Mulberry Ring spot:

The disease is very common in Japan and China and caused by a virus belonging to the Nepovirus group (Tsuchizaki *et al.*, 1971; Yagita and Komura, 1972; Ertian, 2003). The ring spot virus transmitted by an ectoparasite nematode, *Longidorus martini* (Yagita and Komura, 1992), mechanically by sap inoculation, through grafting and vegetative propagation (Tsuchizaki *et al.*, 1971; Yagita and Komura, 1972). Generally, the disease occurs in sandy soils. The virus is a polyhedral/spherical shaped particle of about 22 nm diameter with single-stranded RNA. The symptoms of the disease on leaves appear as mosaic and irregular ring like patterns of varying sizes. Later, the lower surfaces of leaves wrinkle and on severity, the leaves turn yellow and become thread-like. Due to viral infection, the plants exhibit delayed sprouting and poor growth of shoot and roots resulting in severe loss to leaf yield and quality (Minamizawa, 1997; Tsuchizaki *et al.*, 1971; Ertian, 2003).

Mulberry Latent Virus:

The disease is caused by a virus, which remains latent in the system of mulberry plant. As the virus is unable to cause the visible symptoms on mulberry it has been called latent virus. The virus belonging to the Carlavirus group is a filamentous particle measuring 700 nm in length having single-strand of RNA and can be transmitted mechanically by sap inoculation and through grafting (Tsuchizaki, 1976).

Mulberry Yellow-Net Vein:

Yellow-net vein disease is restricted only to India (West Bengal and Jammu & Kashmir) and transmitted through wedge, root and bud grafting. The information on the morphology of the virus is not available. The symptoms appear on the leaf margins as chlorotic patches, later spreading to the whole leaf. Under severity, the veins and vein-lets become completely yellow, giving a net-like appearance (Raychaudhuri *et al.*, 1961; Koul *et al.*, 1991).

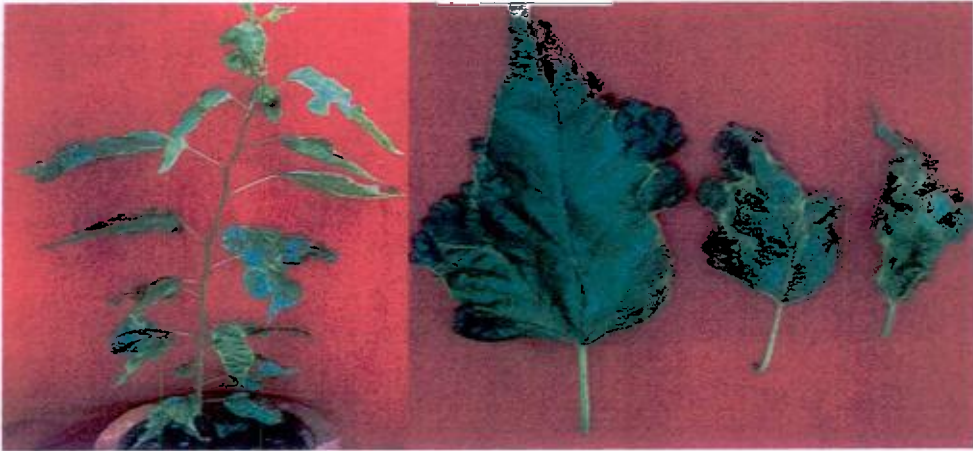


Fig. 3. Mulberry Yellow Streak.

Fig. 3. Stries jaunes du mûrier.

Mulberry Yellow Streak:

Recently, yellow streak disease was reported on mulberry in India in variety V-1 from Kolar, Bangalore Rural, Mandya and Mysore districts of Karnataka. The disease symptoms appeared initially 20–25 days after pruning of infected plants as vein-yellowing on newly emerged young leaves, which later turned into yellowish streaks along the veins and elongated streaks on the lamina (Fig. 3). As disease advanced, the elongated streaks became narrow and confined to the midrib and main veins, while the laminal streaks became more prominent with varying width (about 2–4 mm wide). The wrinkling of leaf lamina along the veins was also observed resulting in deformation of leaf shape and reduction in leaf size (Chowdary *et al.*, 2005).

Mulberry Mosaic Dwarf:

The disease caused by viroid is more prevalent in China and Thailand while in India it is occasional and restricted to certain areas only. The disease appears during spring season and is transmitted through grafting. The preliminary symptoms of disease appear as faint or yellowish green plaques between lateral veins with dark green adjacent tissues leading to yellow and green patterns on mulberry leaves. The leaf margins shrink and tumour-like bulges appear on the veins of lower surface (Fig. 4). As the infection advances, the veins become necrotic-brown, internodal distance reduces resulting in stunted plant growth (Zhang, 1983).



Fig. 4. Mulberry Mosaic Dwarf.

Fig. 4. Nanisme mosaïque du mûrier.

Management of viral and viroid diseases:

Physical/cultural methods:

Physical and cultural methods of disease control include mechanical, thermotherapy and agronomical practices (Minamizawa, 1997; Ertian, 2003; Chowdary *et al.*, 2007).

- The virus or viroid infected plants should be uprooted and burnt as they act as source of infection.
- As these diseases spread through stem cuttings, raising nursery from cuttings of diseased gardens and movement of planting materials from infected regions to disease free zones should be avoided. Diseased saplings in nurseries should be uprooted and burnt.
- Washing of hands or sterilizing the tools used for handling the infected plants can check the spread of the diseases.
- Since most of the viruses and viroids get inactivated by high temperature, seeds and stem-cuttings should be subjected to heat treatments by dipping in hot water (35-54° C) for 10 - 15 minutes.

Chemical method:

It includes spraying of chemicals and application of soil disinfectants to check the pathogens and vectors (Zhang, 1983; Minamizawa, 1997; Ertian, 2003).

- The nematode vectors present in deeper layers of soil, can be eliminated using soil fumigant.
- Spraying of Thiouracil solution (100 ppm) on affected plants twice before summer pruning delays the viroid multiplication, resulting in increased leaf yield in subsequent harvests.
- Foliar application of certain growth substances like Gibberellic acid may overcome the stunting induced by the viruses/ viroids and stimulate the growth of suppressed axillary buds in infected plants.

Host Resistance:

Varieties Ichinose and Kairyonezumegaeshi of *Morus alba*, and Oshimasho and Kosen of *M. latifolia* were reported to be resistant against mosaic disease (Raychaudhuri *et al.*, 1965) and can be used for plantation in disease prone areas.

(III). DISEASE CAUSED BY FASTIDIOUS XYLEM INHABITING BACTERIUM

Fastidious Xylem Inhabiting Bacterium (FXIB) is a prokaryotic plant pathogen, which is difficult to isolate by standard bacteriological procedures (Raju and Wells, 1986). FXIB thriving in xylem cells of plants, have a wide host range affecting various crops like grape, oleander, oak, almond, peach, pear, citrus, coffee, maple, mulberry, elm, sycamore and alfalfa, where the bacterium inhabits the xylem tissues. Vectors like xylem sap-feeding insects acquire the bacterium by feeding on infected plants and subsequently infect other plants (Freitag, 1951; Raju and Wells, 1986; Kostka *et al.*, 1986; Hopkins and Adlerz, 1988; Sherald and Kostka, 1992; Gupta and Sharma, 1998). Diseased plants had a reduced xylem efficiency or water conducting potentiality (Kostka *et al.*, 1986) due to the occlusion of the vessels by the bacteria, tyloses or extracellular products produced by the pathogen (Hopkins, 1989). In mulberry, FXIB causes the leaf scorch disease, which is also known as marginal leafburning. The symptoms of the disease appear when (i) soil has less moisture; (ii) water is lost too quickly from the leaves (iii) fungi or bacteria invade and plug the water-conducting vessels (xylem) in the plant (Raju and Wells, 1986; Kostka *et al.*, 1986).

Mulberry Leaf Scorch (MLS):

Kostka *et al.* (1986) for the first time reported leaf scorch disease in red mulberry (*Morus rubra* L.) caused by FXIB in Washington, DC. Further, the MLS disease was detected from white mulberry (*Morus alba* L.) trees in southern California, USA. Four MLS bacterial strains were isolated from two locations and confirmed as *Xylella fastidiosa* by enzyme-linked immunosorbent assay

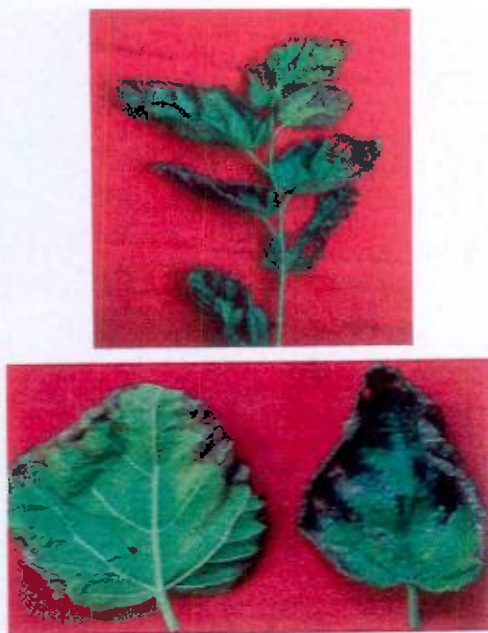


Fig. 5. Mulberry Leaf Scorch.

Fig. 5. Brûlure de la feuille de mûrier.

(ELISA) and direct isolation of the pathogen. These strains were distinct from strains causing almond leaf scorch, oleander leaf scorch, and Pierce's diseases (Martinez *et al.*, 2006). Chen *et al.* (2000) categorized three strain groups based on 16S ribosomal DNA sequences into (i) citrus and coffee; (ii) grapevine and mulberry and (iii) elm, oak, peach, plum and periwinkle. The MLS disease of mulberry with an intensity of 8-10% is also reported in India (Chowdary *et al.*, 2004).

The symptoms of disease appear initially as marginal leaf desiccation and inward curling. Marginal leaf browning and undulating leaf necrosis with a distinctive chlorotic halo are the symptoms in advanced stage. The necrosis initially starts in the desiccated tissues and spreads to the healthy tissues resulting in a scorched appearance. The affected branches show similar symptoms of die back and as infection progresses, vigour of infected plants decline followed by premature defoliation (Fig. 5). The bacterium is small (0.25-0.5 x 1.0-5.0 μm), gram negative, non-motile, non sporulated, having a thick rippled cell wall and does not grow on conventional bacteriological media (Kostka *et al.*, 1986; Chowdary *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006).

Management of MLS:

Scanty information is available on the management of MLS. Being a systemic disease, the following control measures have been suggested to avoid the spread of disease and for minimizing the crop loss (Kostka *et al.*, 1986; Chowdary *et al.*, 2004).

- Diseased plants should be removed and destroyed immediately.
- Strict quarantine measures should be followed.
- Disease-free material should be selected for plantation.

(IV). DISEASE CAUSED BY SPIROPLASMA

Spiroplasmas are a group of small bacteria belonging to the family Spiroplasmataceae of order Entomoplasmatales under class Mollicutes. They are fastidious organisms, lacking cell walls and chlorophyll, requiring a rich culture medium. Most of the spiroplasmas are found either in the gut or haemolymph of insects, or in the phloem of plants. These spiral microbes are different from the true mycoplasmas, as they can be grown on artificial media and cause the disease in plants, when inoculated through insect. Due to their distinct structure and other variations, these organisms were placed in a new group called as spiroplasma (Freundt, 1981). In mulberry, spiroplasma causes the crinkle mosaic disease.

Mulberry crinkle mosaic:

Crinkle mosaic disease is caused by a spiroplasma closely resembling *Spiroplasma citri* and reported to be distributed in several places of Zhejiang province of China (Govindaiah and Sharma, 1993; Zhang *et al.*, 2000).

Disease Symptoms:

Crinkling starts from apical leaves due to which the leaf area is reduced. Plant shows a bunched upright stunted growth and finally the shoots become soft (Govindaiah and Sharma, 1993; Zhang *et al.*, 2000).

Disease cycle:

The disease is transmitted through grafting and also by the vectors (leaf hoppers). The spiroplasma is a cell wall free prokaryote, spherical/spiral in shape measuring 83-700 μm in diameter. The pathogen thrives in the phloem of leaves, branches, roots of mulberry plant and overwinters in the roots. The vectors (leaf hoppers) like *Erythroneura mori* and *Amrasca biguttula biguttula* feed on the diseased plants and acquire the spiroplasma. The leafhoppers after incubation of two to three weeks

start feeding on healthy plants and transmit the spiroplasma (Govindaiah and Sharma, 1993; Zhang *et al.*, 2000).

Control measures:

The following control measures can be adopted for preventing the disease (Govindaiah and Sharma, 1993; Zhang *et al.*, 2000).

1. Strict quarantine methods should be followed.
2. Affected plants should be destroyed by burning.
3. Spraying of oxytetracycline at 0.1% concentration on diseased plants can reduce the disease severity.

FUTURE STRATEGY FOR TACKLING THE SYSTEMIC DISEASES

The systemic diseases are considered as major diseases in China, Japan, Korea and Thailand and occur occasionally in India, Srilanka and Pakistan. In countries such as Brazil, Thailand, Nepal, Uzbekistan and Vietnam, the occurrence of systemic diseases has not been reported. As mulberry is a perennial crop, once the mycoplasma/viral/ viroid/spiroplasma diseases get established in the field, it becomes difficult to eradicate as the pathogens persist throughout the life of plants due to their intracellular development in the host tissue. Hence, it is essential to diagnose the pathogens causing systemic diseases at initial stage of disease development and adopt appropriate management for avoiding the crop loss.

As the systemic diseases spread through the planting material, strict quarantine measures need to be followed in all sericultural countries while getting the planting material. The reports on Polymerase Chain Reaction (PCR) based classification of systemic pathogens are available (Chen *et al.*, 2000) for better screening of pathogens. Application of various biotechnological tools such as protein profiling, RAPD (Random amplified polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) and EST (Expressed Sequence Tag) may help to develop accurate diagnostic/ disease management methods of systemic infection in mulberry.

REFERENCES

- BISWAS S. & SENGUPTA K. (1994) Genetic control of disease resistance in mulberry. *Sericologia*, 34: 33-42.
- CHEN J.Y. (1984) A preliminary study on mulberry mosaic disease. *Guangdong Agric. Sci.*, 1: 33-34.
- CHEN J.Y. (1995) A study on mulberry mosaic disease. *Acta Sericologica Sinica (Canye Kexue)*, 21: 9-14.
- CHEN J., JARRET R. L., JARRET R. L., QIN X., HARTUNG J. S., BANKS D., CHANG C. J. & HOPKINS D. L. (2000) 16S rDNA sequence analysis of *Xylella fastidiosa* strains. *Syst. Appl. Microbiol.*, 23:349-54.
- CHOWDARY N. B., MALA V. R. & DANDIN S. B. (2007) Management of mulberry yellow streak disease. *Indian Silk*, 46:8-9.
- CHOWDARY N. B., SHARMA D. D., NAIK V. N. & MALA V. R. (2004) Mulberry leaf scorch caused by a fastidious, xylem-inhabiting bacterium - A new report from India. In: *Progress of research on disease and pest management in sericulture*. Govindan R., Naika R. and Sannappa B. (eds.), Seri Scientific Publishers, Bangalore, pp.26-28.
- CHOWDARY N. B., GUPTA V. P., MALA V. R. & DANDIN S. B. (2005) Mulberry yellow streak disease - a new report from India. *Indian J. Seric.*, 44: 215-217.
- DOI Y., TERANAKA M., YORA K. & ASUYAMA H. (1967) Mycoplasma or phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia

- witches' broom. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn (Nihon Shokubutsu Biyori Gakkai-Ho), 33: 259-266.
- ERTIAN H. (2003) Protection of mulberry plants. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 2-15.
- FLORES R., HERNANDEZ C., MARTINEZ DE ALBA A. E., DAROS J. A. & DI SERIO, F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. Ann. Rev. Phytopathol., 43:117-139.
- FREITAG J. H. (1951) Host range of the pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. Phytopathology, 41:920-934.
- FREUNDT E. A. (1981) Isolation, characterization and identification of spiroplasmas and MLOs. In: Mycoplasma Diseases of Trees and Shrubs. Maramorosch K. and Raychaudhuri S. P. (eds.), Academic Press, New York, USA, pp. 147-184.
- FUKUDA T., SUDA M., MATSUDA M., MAYASHI T., KOUROSO T., HORIUSHI Y. & FLORRIN M. (1959) Formation of the silk protein during the growth of the silkworm. Biochem., 12, 90-112.
- GOVINDAIAH & SHARMA D. D. (1993). Report on Advance Training on Management of Mulberry Diseases and Pests. Zhejiang Agric. Univ., Hangzhou, China.
- GOVINDAIAH & SHARMA D. D. (1994) Root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting mulberry—A Review. Indian J. Seric., 33: 110-113.
- GUPTA V. P. (1999) On the occurrence of green mosaic disease on mulberry in India. Indian Phytopathol., 52:154-155.
- GUPTA V. P. (2001) Diseases of mulberry and their management. In: Plant Pathology (P.C. Trivedi Ed.), pp. 130-164. Pointer Publishers, Jaipur, India.
- GUPTA V. P. (2005) Development of diseases in mulberry (*Morus* sp.): host-pathogen interactions. In: Plant Diseases-Biocontrol Management (Nehra S. Ed.), pp. 340-366.
- GUPTA A. K. & SHARMA R. C. (1998) Almond leaf scorch – A serious threat to almond cultivation in Himachal Pradesh. Indian Phytopath., 51:203.
- HOPKINS D. L. (1989) *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. Ann. Rev. Phytopathol., 27:271-290.
- HOPKINS D. L. & ADLERZ W. C. (1988) Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. Plant Dis., 72:429-431.
- ISHIIE T., DOI Y., YORA K. & ASUYAMA, H. (1967) Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 33:267-275.
- ISHIIE T., YAMAKAWA Y. & MIZUTANI M. (1971) On the application of antibiotics of tetracycline group to the mulberry trees attacked with mulberry dwarf disease. J. Seric. Sci. Jpn., 40:395-398.
- ISHIJIMA T. (1971) Transmission of the possible pathogen of mulberry dwarf disease by a new leafhopper vector, *Hishimonoides sellatiformis* Ishihara. J. Seric. Sci. Jpn., 40: 136-140.
- ISHIJIMA T. & ISHIIE T. (1981) Mulberry dwarf: First tree mycoplasma disease of mulberry. In: Mycoplasma Diseases of Trees and Shrubs (K. Maramorosch and S.P. Raychaudhuri Eds.), pp. 147-184. Academic Press, New York, USA.
- KAWAKITA H. (1977) Electron microscopic studies on the mulberry dwarf disease. II. Seasonal differences of a causal agent, mycoplasma-like organism, in the tissues of infected mulberry plant. J. Seric. Sci. Jpn., 46: 404-410.
- KAWAKITA H. & ISHIIE T. (1970) Electron microscopic studies on the mulberry dwarf disease. (1) The presence of mycoplasma-like organisms in viruliferous leafhoppers, *Hishimonus sellatus* Uhler and *Hishimonoides sellatiformis* Ishihara. J. Seric. Sci. Jpn., 39: 413-419.
- KAWAKITA H. & KATSUHARA M. (1993) Detection of mycoplasma like organisms in the phloem sap collected from mulberry trees with dwarf disease. J. Seric. Sci. Jpn., 62: 125-131.
- KOUL A., DEVI S. P. & SINGH, D. (1991) On occurrence of yellow-net vein disease on mulberry. Indian Phytopathol., 44: 106-107.
- KOSTKA S.J., TATTAR T.A., SHERALD J. L. & HURTT, S. S. (1986) Mulberry leaf scorch, new disease caused by a fastidious xylem inhabiting bacterium. Plant Disease, 70: 690-693.

- KUAI Y. Z., ZHU F. P., XIA Z. S. & CHEN P. G. (1997) Studies on the mechanism of mulberry resistance to the mulberry yellow dwarf disease. *Sericologia*, 1997, 37(2) : 233-240.
- KUMAR N. N. U. (1991) Effect of mosaic virus on physiology of mulberry (*Morus alba* L.). *Adv. Plant Sci.*, 4: 183-185.
- LA Y.J. (1987) Current status of researches on mycoplasmal diseases of plants in Korea. *Korean J. Plant Pathol.*, 3: 22-27.
- LEI G. X., JIN Y., LI Z., TAN S. & PENG, S. (1997) Study on resistance of different mulberry varieties *Hishimonus sellatus* Uhler. *Bulletin on Sericulture*, 28:32-34.
- LIM S. H., KIM Y. T., LEE S. P., RHEE I. J., LIM J. S. & LIM B. H. (1994) *Sericulture training manual*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., pp.37-39.
- MAJI M. D. & QADRI S. M. H. (1999) Bacterial diseases of mulberry (*Morus* spp). *Sericologia*, 39:1-7.
- MARTINEZ R. H., PINCKARD T. R., COSTA H. S., COOKSEY D. A. & WONG, F. P. (2006) Discovery and characterization of *Xylella fastidiosa* strains in Southern California causing mulberry leaf scorch. *Plant Dis.* 90: 1143-1149.
- MINAMIZAWA K. (1997) *Moriculture – Science of Mulberry Cultivation*. Oxford & IBH Pub. Co. Pvt. Ltd.
- MURAKAMI M. (1973) Utilization of improved F-1 populations in mulberry cultivation. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 26, 1-57, Tokyo.
- PHILIP T. GUPTA V. P., GOVINDAIAH, BAJPAI A. K. & DATTA R. K. (1994) Diseases of mulberry in India -Research priorities and management strategies. *Int. J. Trop. Plant Dis.* 12: 1-21.
- RAJU B. C. & WELLS J. M (1986) Diseases caused by fastidious xylem limited bacteria and strategies for management. *Plant Disease*, 70:182-186.
- RAMAKRISHNAN S. & SENTHILKUMAR T. (2003) Plant parasitic nematodes, a serious threat to mulberry – A review. *Indian J. Seric.*, 42: 82-92.
- RANGASWAMI G. & MAHADEVAN A. (1999) *Diseases of Crop Plants in India* (4th Eds.), Prentice Hall of India, Pvt., New Delhi, India, pp.1-536.
- RAYCHAUDHURI S. P., CHATTERJEE S. N. & DHAR H. K. (1961) Preliminary note on the occurrence of the yellow-net vein disease of mulberry. *Indian Phytopathol.*, 14: 94-95.
- RAYCHAUDHURI S. P., CHATTERJEE S. N. & DHAR H. K. (1962) A mosaic disease of mulberry. *Indian Phytopathol.*, 15: 187-189.
- RAYCHAUDHURI S. P., GANGULY B. & BASU A. N. (1965). Further studies on mosaic of mulberry. *Plant Dis. Repr.*, 49: 981.
- SENGUPTA K., KUMAR P., BAIG M. & GOVINDAIAH (1990) *Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm*. United Nations, Economic and Social Commission for Asia and the Pacific Bangkok, Thailand, pp. 1-15.
- SHARMA D. D. (2004). Foliar diseases of mulberry and their management – LEAD PAPER. In: *Advances in disease and pest management in sericulture*. Govindan R., Ramakrishna Naika and Sannappa, B (eds.). Seri Scientific Publishers, Bangalore. pp. 1-21.
- SHARMA D. D., NAIK V. N., CHOWDARY N. B. & MALA V. R. (2003) Soilborne diseases of mulberry and their management – A review. *Int. J. Indust. Entomol.*, 7: 93-106.
- SHARMA D. D., CHOWDARY N. B., NISHITHA NAIK V., MALA V. R. & DANDIN S. B. (2005). Blight diseases of mulberry (*Morus* spp.) – A review. *Sericologia*, 45: 231-245.
- SHERALD J. L. & KOSTKA S. J. (1992) Bacterial leaf scorch of landscape trees caused by *Xylella fastidiosa*. *J. Arboric.*, 18:57-63.
- SRI SOMCHAI T. & BROWN M. W. (1971) Mulberry mosaic - An initial report for Thailand. *Thai J. Agric. Sci.*, 4: 63-70.
- TAHAMA Y. (1967) Studies on the dwarf disease of mulberry tree. XVI. On two strains. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 33: 156-161.
- TAHAMA Y. (1975) Studies on the mulberry dwarf disease, 23: Electron microscopic examination on the Mycoplasma-like organisms in the overwintered mulberry trees. *Plant diseases*, 5:151-158.

- TAKAHASHI K. (1975) Chemical control of mulberry diseases in Japan. Japan Pesticide Information No. 25: 27-31.
- TAKEUCHI Y. (1960) Ability of silkworm (*Bombyx mori* L.) to recover from malnutrition. The Silk News Letter, 5: 6-7.
- TEOTIA R. S. & SEN, S. K. (1994). Mulberry diseases in India and their control – a preview. Sericologia, 34:1-19.
- TSUCHIZAKI T. (1976) Mulberry latent virus isolated from mulberry (*Morus alba* L.). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 42: 304-309.
- TSUCHIZAKI T., HIBINO H. & SAITO Y. (1971) Mulberry ringspot virus isolated from mulberry showing ringspot symptom. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 37: 266-271.
- WU Z. J., CHEN P.G., XIA M. J. & SHI B. K. (1992) Identification of mulberry germplasm's resistance to mulberry yellow dwarf disease. Acta Sericologica Sinica (Canye Kexue), 18: 6-11.
- YAGITA H. & KOMURA Y. (1972) Transmission of mulberry ringspot virus by *Longidorus martini* Merny. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 38: 275-283.
- YAGITA H. & Y. KOMURA (1992) Transmission of mulberry ringspot virus by *Longidorus martini* Merny. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 38, 275-283.
- ZHANG Y. J. (1983) Studies on the mulberry mosaic dwarf disease. Sci. Seric. (Canye Kexue), 9: 74-79.
- ZHANG Y. J., HONG J., WU J. P. & WAND E. G. (2000) The survival, distribution, and reproduction form of plant spiroplasma. Zhejiang agricultural journal, 12:11-15.
- ZHENG T. Z., TAN Y. F., HUANG G. X., FAN H. & MA, B. (1988) Mulberry Cultivation. FAO Agric. Service Bull. 73/1, FAO Publications, Rome, pp.91-95.

REVUE SUR LES MALADIES SYSTEMIQUES DU MURIER

D. D. SHARMA, N. B. CHOWDARY, V. NISHITA NAIK & V. R. MALA

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

*Le mûrier (*Morus spp.*) l'unique source de nourriture du ver à soie (*Bombyx mori* L.) est atteint par de nombreuses maladies foliaires ou originaires du sol ou systémiques. Parmi elles, les maladies systémiques sont les plus dangereuses, car elles se répandent de manière interne dans tout le système de la plante, elles sont provoquées par des pathogènes tels que les organismes ressemblant aux mycoplasmes (MLO) ou les mycoplasmes, les virus, les viroïdes, les bactéries de type *fastidiosa* habitant le xylème (FXIB) et les spiroplasmes. Les maladies systémiques sont présentes dans tous les pays séricicoles du monde. Les maladies variées provoquées par ces pathogènes, sont le nanisme, la mosaïque, la tache de l'anneau, le filet de nervures jaunes, les bandes jaunes, le virus latent, le nanisme mosaïque, la brûlure de la feuille, la mosaïque froissée du mûrier etc... Des mesures préventives appropriées et opportunes sont nécessaires pour éviter les épidémies provoquées par ces maladies pour la production qualitative et quantitative de feuilles de mûrier. Nous passons en revue dans cet article les différentes maladies systémiques du mûrier.*

INTRODUCTION

On appelle aussi les maladies systémiques « maladies véhiculées par des vecteurs », puisqu'elles sont transmises par des vecteurs comme les insectes et les nématodes. En général, les maladies systémiques sont provoquées par des pathogènes tels que les organismes ressemblant aux mycoplasmes (MLO), les mycoplasmes, les virus, les viroïdes, les bactéries de type *fastidiosa* habitant le xylème (FXIB) et les spiroplasmes. Les maladies systémiques sont un problème grave dans les pays comme le Japon et la Chine. En Inde, bien que ces maladies soient de nature sporadique, une fois que le mûrier est infesté, cela peut entraîner des dégâts répétés, qui diminuent le rendement et la qualité foliaire. Non seulement, les maladies systémiques diminuent le rendement foliaire de l'ordre de 15 à 20 % (Kumar, 1991 ; Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003), mais elles détériorent aussi la qualité de la feuille surtout les protéines, qui sont la source principale pour la synthèse de la soie par le ver (Fukuda et coll., 1959 ; Takeuchi, 1960). Bien qu'il existe des revues sur les maladies du mûrier foliaires ou originaires du sol (Govindaiah et Sharma, 1994 ; Philip et coll., 1994 ; Teotia et Sen, 1994 ; Maji et Qadri, 1999 ; Sharma et coll., 2003 ; Ramakrishnan et Senthilkumar, 2003 ; Sharma, 2004 ; Sharma et coll., 2005), il n'y a pas eu de tentative pour passer en revue les informations disponibles jusqu'à présent sur les maladies systémiques du mûrier. Nous avons donc entrepris cette étude pour mettre à jour les informations disponibles sur les maladies systémiques chez le mûrier.

(I). MALADIES MYCOPLASMIQUES

Les mycoplasmes sont de petits organismes parasites qui sont connus pour provoquer des maladies chez les plantes. Ces organismes produisent des corps sphériques à ellipsoïdaux plus petits que les bactéries mais plus grands que des particules virales. Les mycoplasmes vivent dans les tissus du phloème des plantes, qui contient des protéines, de l'ADN, de l'ARN et des enzymes. Les corps élémentaires des mycoplasmes varient en forme et en taille. On a signalé que de nombreuses maladies des plantes, que l'on pensait auparavant être provoquées par les virus, sont provoquées par les

mycoplasmes. Ils sont sensibles à la chaleur et à certains antibiotiques (Ishijima et Ishiie, 1981). Chez le mûrier, les mycoplasmes provoquent la maladie du nanisme.

Nanisme du mûrier :

Chez le mûrier, on a d'abord signalé la maladie au Japon (Doi et coll., 1967) et en raison de sa présence importante, elle est considérée comme l'une des maladies les plus destructrices au Japon (Takahashi, 1975 ; Minamizawa, 1997), en Chine (Ertian, 2003) et en Corée (La, 1987). Au Japon, on a signalé que la superficie endommagée par la maladie du nanisme représentait environ 12 % de la superficie totale de mûriers cultivés en 1916 (Ishijima et Ishiie, 1981). En Chine, la maladie s'appelle la maladie du nanisme jaune / la maladie des déchets / du bossu / de l'oreille de chat et le taux d'infestation des branches est très élevé (50 à 80 %), avec une perte de rendement foliaire jusqu'à 70 % (Zheng et coll., 1988 ; Ertian, 2003). La maladie est présente toute l'année, mais on remarque une incidence élevée de mai à septembre dans les provinces de Jiangsu et de Zhejiang. La maladie est provoquée par un organisme ressemblant à un mycoplasme (MLO) et transmise par des vecteurs comme *Hishimonus sellatus* Uhler (la cicadelle à tête verte) et *Hishimonoides sellatiformis* Ishihara (la cicadelle à tête rouge) (Tahama, 1975 ; Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003). On a signalé que deux souches génétiquement distinctes de MLO provoquent la maladie du nanisme du mûrier, c'est à dire *Tamana* et *Kikuchi*, la première provoquant une infestation sévère chez le mûrier et la dernière une infestation modérée (Tahama, 1967 ; Kawakita, 1977 ; Ishijima et Ishiie, 1981). Bien qu'on n'ait pas signalé la présence de la maladie du nanisme en Inde, on ne peut pas écarter son éruption, en raison de la culture intensive du mûrier dans les zones non traditionnelles du pays (Gupta, 2001 ; 2005).

Symptômes de la maladie et nature des dégâts :

Les symptômes de la maladie apparaissent au stade initial comme l'enroulement de la feuille apicale. Plus tard, les feuilles de la plante affectée diminuent en taille et les nervures deviennent fines et transparentes. Le limbe de la feuille devient plus court, se recourbe vers le bas et la surface se froisse sévèrement. Les bourgeons axillaires germent plus tôt que ceux qui ne sont pas atteints, les entrenœuds et les branches latérales deviennent plus courts, ce qui donne l'apparence d'un balai de sorcière (Fig. 1).

Les tissus conducteurs des plants de mûrier sont sévèrement atteints par l'infestation par la maladie, ce qui entraîne de nombreux désordres physiologiques comme une faible transpiration et la rétention de l'amidon dans le mésophylle des plants, à cause de la non-translocation à travers les pétioles (Ishijima et Ishiie, 1981). De plus, on a signalé que les lipides bruts et les fibres brutes sont extrêmement bas chez les feuilles malades, tandis que l'amidon assimilable et la teneur en sucres sont plus élevés que chez les feuilles saines (Zheng et coll., 1988). Au stade avancé de l'infestation, les plants deviennent extrêmement recourbés, perdent leur vitalité et meurent en l'espace de 2 à 3 ans (La, 1987 ; Ishijima et Ishiie, 1981 ; Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003).

On a réussi à isoler les pathogènes de la maladie du nanisme du mûrier (MLO) par stylectomie (retrait des stylets des insectes par la méthode au laser d'Yttrium Aluminum Garnet (YAG)) en utilisant un insecte homoptère, *Ricania japonica*. On détecte les MLO dans la sève du phloème chez les plantes de mûrier malades, sous la forme de particules fluorescentes colorées avec du 4, 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) sous un microscope à fluorescence, mais ils sont absents de la sève des plants de mûrier sains. La microscopie électronique a aussi confirmé la présence de MLO dans la sève du phloème (Kawakita et Katsuhara, 1993).

Cycle de la maladie :

La maladie est systémique et se propage au début par des vecteurs (*H. sellatus* et *H. sellatiformis*) et l'infestation secondaire se produit par la plantation de greffons / de boutures / de jeunes plants malades. Le MLO qui provoque le nanisme du mûrier est limité principalement aux tubes criblés et aux parenchymes contigus du phloème, en passant par les pores criblés et le plasmodème des

cellules du phloème. On trouve plus de corps MLO dans les jeunes tiges, feuilles et racines des plantes de murier et moins dans les tissus les plus vieux. Ils sont soit sphériques soit ellipsoïdaux, compris entre 50 à 800 nm de diamètre, bordés par une membrane unitaire à deux couches d'environ 8 nm d'épaisseur et contiennent des ribosomes et des brins d'acides nucléiques (Ishijama et Ishiie, 1981 ; Kawakita et Katsuhara, 1993 ; Ertian, 2003). On trouve quatre générations des deux vecteurs annuellement. On a signalé que les 1^{ère} et 4^{ème} générations de la cicadelle à tête verte (*H. sellatus*) et que les quatre générations de la cicadelle à tête rouge (*H. sellatiformis*) transmettent le pathogène chez le mûrier (Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003). La période minimum d'acquisition – d'alimentation pour les vecteurs est de 3 heures. Le mycoplasme du nanisme du mûrier hiberne dans les tissus de la plante pendant les conditions défavorables et entraîne les symptômes de la maladie pendant les conditions favorables (20 à 25° C). La sévérité de la maladie est directement liée au nombre de mycoplasmes détectés dans les tissus malades. Une fois acquise, les cicadelles retiennent l'infectiosité des mycoplasmes du nanisme du mûrier jusqu'à leur mort (Kawakita et Ishiie, 1970 ; Ishijima, 1971 ; Tahama, 1975 ; Kawakita, 1977 ; Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003).

Lutte contre la maladie des mycoplasmes :

Méthodes physiques / culturales :

Elles incluent la lutte mécanique, la thermothérapie, les pratiques agronomiques ainsi que la résistance de l'hôte (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Lim et coll., 1994 ; Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003).

- Il faut sélectionner du matériel sans maladie pour la plantation.
- Il faut retirer et détruire immédiatement les plants malades.
- Il faut suivre des mesures de quarantaine strictes.
- On peut éliminer l'infestation des greffons / des boutures de mûrier en les trempant dans de l'eau chaude pendant 15 à 20 minutes à 50 ° C ou de 2 à 5 minutes à 55° C.
- On peut éliminer l'infestation des jeunes plants malades en trempant le système racinaire dans de l'eau chaude pendant 15 minutes à 50° C ou pendant 30 minutes à 45° C avant la plantation.
- Il faut tailler les plants à une hauteur élevée et il faut éviter de trop cueillir les feuilles entre les saisons du printemps et de l'été.

Méthodes chimiques :

Les méthodes chimiques de lutte contre la maladie comprennent la vaporisation d'antibiotiques pour lutter contre le pathogène et exterminer les vecteurs avec des produits chimiques (Ishiie et coll., 1967 ; 1971 ; Takahashi, 1975 ; Ertian, 2003).

• Pour la lutte contre le pathogène :

La vaporisation foliaire d'une solution à 100 ppm d'hydrochlorure de tétracycline (TC-HCl), à un intervalle de 2 à 3 jours après la taille d'été, supprime le développement du symptôme seulement pendant une courte durée.

• Pour la lutte contre les vecteurs :

On peut vaporiser ou saupoudrer du Phenthoate, du Trichlorfon, du Vamidothion, de l'Allyxycarbe, du Calvinphos ou du Propoxur (dilution au millième) au taux de 3 à 5 kg / ha deux fois, pendant le stade du bourgeonnement et après le développement de la feuille pour l'extermination de la cicadelle.

• On recommande la vaporisation foliaire de DDVP (Diclorvos) pour tuer les vecteurs et d'autres insectes nuisibles.

Résistance de l'hôte :

On a signalé la résistance de plusieurs hybrides de Kataturi, de Mitskheturi, de Gibird2, de Gruzniish-4, d'Oshima, de Yu-2, d'Husang-7, de Xiao Baitiao et de Xiang-456 à la maladie du nanisme du mûrier (Wu et coll., 1992 ; Biswas et Sengupta, 1994 ; Lei et coll. ; 1997, Kuai et coll., 1997). Murakami (1973) a signalé que chez le mûrier, la résistance à la maladie contre les mycoplasmes est héréditaire. On peut planter des variétés résistantes telles que Kataturi × Gruzniish-4, Lu × Gruzniish-5 et PS-9 × Tbilisuri dans les zones sujettes à la maladie.

(II) MALADIES VIRALES ET VIROÏDES

Les virus sont des particules sous-microscopiques qui infestent les cellules de l'hôte et sont constituées en général d'acides nucléiques et de protéines. Les virus des plantes ont différentes formes et tailles. Ils sont allongés (bâtonnets rigides ou fils flexueux), sphériques (isométriques ou polyédraux) et cylindriques. Le virus allongé a la forme d'un bâtonnet et mesure 46 à 300 nm de longueur et 18 à 22 nm de largeur, tandis que les fils flexueux font 470 à 2000 nm de long et 8 à 13 nm de largeur. Les viroïdes associés à certaines maladies des plantes possèdent des acides nucléiques à faible masse moléculaire ne contenant que de l'ARN. Ils sont semblables à des virus, et manquent de protéines d'encapsulation et se propagent par les outils et les appareils mécaniques (Zhang, 1983 ; Flores et coll., 2005).

Il existe plusieurs rapports sur la dévastation de nombreuses cultures comme le santal, la noix de coco, la banane, la pomme, le citron, la vigne, etc... par des virus (Rangaswami et Mahadevan, 1999). Les maladies virales du mûrier sont plus répandues dans les pays comme la Chine, le Japon, la Corée, le Sri Lanka, la Thaïlande, etc.. En Inde, l'incidence des maladies virales est sporadique (Gupta, 2005). En Chine, on a aussi signalé que le viroïde provoque la maladie du nanisme mosaïque (Zhang, 1983). En Inde, pour la première fois, Raychaudhuri et coll., (1961) ont signalé la présence de maladies virales chez le mûrier dans le Bengale de l'Ouest. Par la suite, on a signalé l'incidence sporadique de maladies virales chez le mûrier dans différentes parties du pays (Raychaudhuri et coll., 1962 ; Koul et coll., 1991 ; Gupta, 2001 ; Chowdary et coll., 2005).

Mosaïque du mûrier :

La maladie mosaïque est très courante en Chine, en Thaïlande et en Inde. On a signalé que le virus qui provoque la maladie mosaïque en Chine est une particule filamenteuse d'environ 400 à 1000 nm de longueur et de 12 à 16 nm de largeur (Chen, 1995). La maladie se propage principalement par les plantes infestées. La transmission de la maladie se produit par les insectes vecteurs (*Rhopalosiphum maidis* Fitch., *Myzus persicae* Sulz. et *Aphis gossypii* Glov.), le greffage et l'inoculation de la sève (Raychaudhuri et coll., 1965 ; Sengupta et coll., 1990). Les plants de mûrier infestés de manière virale présentent des symptômes caractéristiques comme la clarification des nervures, suivi par un motif de mosaïque vert foncé et clair sur les feuilles (Fig. 2). En cas d'attaque sévère, les feuilles deviennent déformées, tordues et entortillées et la croissance de la plante est chétive (Raychaudhuri et coll., 1962 ; Srisomchai et Brown, 1971 ; Chen, 1984 ; Kumar, 1991 ; Gupta, 1999 ; 2005).

Maladie de la tache en anneau du mûrier :

La maladie est très courante au Japon et en Chine et est provoquée par un virus qui appartient au groupe des Nepovirus (Tsuhizaki et coll., 1971 ; Yagita et Komura, 1972 ; Ertian, 2003). Le virus de la tache en anneau est transmis mécaniquement par un nématode ectoparasite, *Longidorus martini* (Yagita et Komura, 1992) par l'inoculation de la sève, par la multiplication par greffe ou par la multiplication végétative (Tsuhizaki et coll., 1971 ; Yagita et Komura, 1972). En général, la maladie se produit dans les sols sablonneux. Le virus est une particule de forme polyédrique, sphérique, d'environ 22 nm de diamètre, avec un ARN à brin unique. Les symptômes de la maladie sur les feuilles

apparaissent sous la forme de motifs de mosaïque et d'anneaux irréguliers de tailles variées. Plus tard, les surfaces inférieures des feuilles se froissent et en cas d'attaque sévère, les feuilles deviennent jaunes et prennent l'apparence d'un fil. Sous l'effet de l'infestation virale, le bourgeonnement des plantes est retardé et la croissance des pousses et des racines est mauvaise, ce qui entraîne une perte sévère du rendement et de la qualité foliaires (Minamizawa, 1997 ; Tsuchizaki et coll., 1971 ; Ertian, 2003).

Le virus latent du mûrier :

La maladie est provoquée par un virus, qui reste latent dans le plant de mûrier. Comme le virus n'est pas capable de provoquer de symptômes visibles sur le mûrier, on l'a appelé virus latent. Ce virus qui appartient au groupe des Carlavirus est une particule filamenteuse, qui mesure 700 nm de longueur avec un brin unique d'ARN et il peut être transmis mécaniquement par l'inoculation de la sève et par le greffage (Tsuchizaki, 1976).

Filet de nervures jaunes du mûrier :

La maladie du filet de nervures jaunes est limitée à l'Inde (ouest du Bengale et Jammu et Cachemire) et transmise par les greffes du bois, des racines ou des bourgeons. On ne dispose pas d'informations sur la morphologie du virus. Les symptômes apparaissent sur les bords de la feuille comme des pans chlorotiques, qui s'étendent ensuite à toute la feuille. En cas d'attaque sévère, les nervures deviennent complètement jaunes, ce qui donne l'apparence d'un filet (Raychaudhuri et coll., 1961 ; Koul et coll., 1991).

Bandes jaunes du mûrier :

On a récemment signalé la maladie des bandes jaunes du mûrier en Inde chez la variété V-1 dans les zones de Kolar, de Bangalore rural, de Mandya et de Mysore dans le Karnataka. Les symptômes de la maladie apparaissent 20 à 25 jours après la taille des plants infestés, au début comme un jaunissement des nervures sur les jeunes feuilles venant d'émerger, qui plus tard deviennent des bandes jaunâtres le long des nervures et des bandes allongées sur le limbe (Fig. 3). Alors que la maladie progresse, les bandes allongées deviennent étroites et se confinent à la nervure médiane et aux nervures principales, tandis que les bandes du limbe deviennent plus apparentes avec une largeur variable (environ 2 à 4 mm de largeur). On a aussi observé le froissement du limbe de la feuille le long des nervures, ce qui entraîne la déformation de la feuille et fait rétrécir la feuille (Chowdary et coll., 2005).

Nanisme mosaïque du mûrier :

La maladie provoquée par le viroïde est plus présente en Chine et en Thaïlande, tandis qu'en Inde, elle est occasionnelle et restreinte seulement à certaines zones. La maladie apparaît au printemps et est transmise par les greffes. Les symptômes préliminaires de la maladie apparaissent comme des plaques d'un jaune vert pâle entre les nervures latérales et des tissus adjacents vert foncé, qui entraînent des motifs jaunes et verts sur les feuilles de mûrier. Les bords de la feuille rétrécissent et des renflements comme une tumeur apparaissent sur les nervures de la surface inférieure (Fig. 4). Alors que l'infestation progresse, les nervures deviennent marron nécrosé, la distance internodale diminue et la croissance de la plante est chétive (Zhang, 1983).

Lutte contre les maladies virales et viroïdes :

Méthodes physiques et culturales :

Les méthodes physiques et culturales de lutte contre les maladies comprennent les pratiques mécaniques, la thérapie thermique et les pratiques agronomiques (Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003 ; Chowdary et coll., 2007).

- Il faut déraciner les plants infestés par les virus et les viroïdes et les brûler puisqu'ils agissent comme une source d'infestation.
- Comme ces maladies se propagent par les boutures de tige, il faut éviter l'établissement de pépinières avec des boutures provenant de muraies malades et le déplacement des matériaux de plantation, de régions infestées à des zones sans maladie. Il faut déraciner et brûler les jeunes arbres malades dans les pépinières.
- Se laver les mains ou stériliser les outils utilisés pour manipuler les plants infestés peut contenir la propagation des maladies.
- Puisque la plupart des virus et des viroïdes sont désactivés par une température élevée, les graines et les boutures de tiges devraient être soumises à des traitements à la chaleur, en les trempant dans l'eau chaude (35 à 54° C) pendant 10 à 15 minutes.

Méthode chimique :

Elle comprend la vaporisation de produits chimiques et l'application de désinfectants du sol pour contenir les pathogènes et les vecteurs (Shang, 1983 ; Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003).

- On peut éliminer les vecteurs nématodes présents dans les couches les plus profondes du sol en ayant recours à la fumigation du sol.
- La vaporisation de solution de Thiouracil (100 ppm) sur les plants atteints, deux fois avant la taille d'été retarde la multiplication des viroïdes, ce qui entraîne l'augmentation du rendement foliaire au cours des récoltes suivantes.
- L'application foliaire de certaines substances de croissance comme l'acide gibbéréllique pourrait surmonter le rachitisme induit par les virus / viroïdes et stimuler la croissance des bourgeons axillaires supprimés chez les plants infestés.

Résistance de l'hôte :

On a signalé que les variétés Ichinose et Kairyonezumegaeshi de *Morus alba* et Oshimasho et Kosen de *M. latifolia* sont résistantes à la maladie de la mosaïque (Raychaudhuri et coll., 1965) et on peut les utiliser pour la plantation dans les zones sujettes à la maladie.

(III) MALADIES PROVOQUEES PAR LES BACTERIES DE TYPE *FASTIDIOSA* HABITANT LE XYLEME

Les bactéries de type *fastidiosa* habitant le xylème (FXIB) sont des procaryotes pathogènes des plantes, qu'il est difficile d'isoler avec des procédures bactériologiques standard (Raju et Wells, 1986). Les FXIB qui prospèrent dans les cellules du xylème des plantes, ont un grand éventail d'hôtes et affectent des cultures variées comme le raisin, le laurier-rose, le chêne, l'amandier, le pêcher, le poirier, le citronnier, le café, l'érable, le mûrier, l'orme, le sycomore et l'alfalfa, où la bactérie habite les tissus du xylème. Les vecteurs comme les insectes, qui se nourrissent de la sève du xylème, acquièrent la bactérie en se nourrissant sur les plants infestés et par la suite infestent les autres plants (Freitag, 1951 ; Raju et Wells, 1986 ; Kostka et coll., 1986 ; Hopkins et Adlerz, 1988 ; Sherald et Kostka, 1992 ; Gupta et Sharma, 1998). Chez les plants malades, l'efficacité du xylème ou le potentiel conducteur de l'eau diminuent (Kostka et coll., 1986), à cause de l'occlusion des vaisseaux par les bactéries, les thyloses ou les produits extracellulaires produits par le pathogène (Hopkins, 1989). Chez le mûrier, les FXIB provoquent la maladie de la brûlure de la feuille, qui est aussi connue comme la brûlure marginale de la feuille. Les symptômes de la maladie apparaissent quand (i) le sol est moins humide ; (ii) quand les feuilles perdent leur eau trop rapidement ; (iii) quand des champignons ou des bactéries envahissent et bouchent les vaisseaux conducteurs d'eau (xylème) dans la plante (Raju et Wells, 1986 ; Kostka et coll., 1986).

Brûlure de la feuille de mûrier (MLS) :

Kostka et coll., (1986) ont signalé pour la première fois la maladie de la brûlure de la feuille chez le mûrier rouge (*Morus rubra* L.) provoquée par FXIB à Washington DC. Par ailleurs, on a détecté la maladie MLS chez les mûriers blancs (*Morus alba* L.) dans le sud de la Californie, aux USA. On a isolé quatre souches bactériennes de la MLS à deux endroits et l'ELISA (dosage par enzyme liée sur immunosorbant) et l'isolement direct du pathogène ont confirmé que c'était *Xylella fastidiosa*. Ces souches sont distinctes des souches provoquant la brûlure de l'amandier, la brûlure de la feuille du laurier-rose, et les maladies de Pierce (Martinez et coll., 2006). Chen et coll., (2000) ont défini trois groupes de souches, d'après les séquences de l'ADN ribosomique 16S, c'est à dire (i) le citronnier et le café ; (ii) la vigne et le mûrier et (iii) l'orme, le chêne, le pêcher, le prunier et la pervenche. On a aussi signalé la maladie MLS du mûrier avec une intensité de 8 à 10 % en Inde (Chowdary et coll., 2004).

Les symptômes de la maladie apparaissent au début comme un dessèchement marginal et un recourbement de la feuille vers l'intérieur. Le brunissement marginal de la feuille et une nécrose ondulante de la feuille avec un halo chlorotique distinctif sont les symptômes au stade avancé. La nécrose commence au début sur les tissus desséchés et s'étend aux tissus sains, ce qui entraîne une apparence de brûlure. Les branches atteintes présentent des symptômes similaires de dépérissement et alors que l'infestation progresse, la vigueur des plants infestés diminue, suivie par une défoliation prématurée (Fig. 5). La bactérie est petite (0,25 à 0,5 × 1,0 à 5 µm), gram-négative, non mobile, non sporulée, avec une paroi cellulaire ridée et épaisse et ne pousse pas sur des milieux bactériologiques conventionnels (Kostka et coll., 1986 ; Chowdary et coll., 2004 ; Martinez et coll., 2006).

Lutte contre MLS :

On dispose de peu d'information sur la lutte contre MLS. Comme c'est une maladie systémique, on a suggéré les mesures de lutte suivantes pour éviter la propagation de la maladie et pour minimiser les pertes de récoltes (Kostka et coll., 1986 ; Chowdary et coll., 2004).

- Il faut retirer et détruire les plants malades immédiatement.
- Il faut suivre des mesures strictes de quarantaine.
- Il faut sélectionner du matériel sans maladie pour la plantation.

(IV) MALADIE PROVOQUEE PAR LES SPIROPLASMES

Les spiroplasmes sont un groupe de petites bactéries appartenant à la famille des Spiroplasmataceae de l'ordre des Entomoplasmatales sous la classe des Mollicutes. Ce sont des organismes de type *fastidiosa*, qui n'ont pas de paroi cellulaire ni de chlorophylle et qui ont besoin d'un milieu de culture riche. On trouve la plupart des spiroplasmes soit dans l'intestin ou dans l'hémolymph des insectes, ou dans le phloème des plantes. Ces microbes en spirale sont différents des vrais mycoplasmes, car ils peuvent pousser sur des milieux artificiels et provoquer les maladies chez les plantes, quand ils sont inoculés par l'insecte. En raison de leur structure distincte et d'autres variations, on place ces organismes dans un nouveau groupe que l'on appelle spiroplasmes (Freundt, 1981). Chez le mûrier, le spiroplasma provoque la maladie de la mosaïque froissée.

Mosaïque froissée du mûrier :

La maladie de la mosaïque froissée est provoquée par un spiroplasma ressemblant à *Spiroplasma citri* et dont la distribution a été signalée dans plusieurs endroits de la province de Zhejiang en Chine (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Zhang et coll., 2000).

Symptômes de la maladie :

Le froissement commence à partir des feuilles apicales et entraîne la diminution de la surface foliaire. La plante présente une croissance verticale, chétive, par grappes, et finalement les pousses deviennent molles (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Zhang et coll., 2000).

Cycle de la maladie :

La maladie est transmise par les greffes et aussi par les vecteurs (cicadelles). Le spiroplasma est un procaryote sans paroi cellulaire, de forme sphérique / en spirale mesurant 83 à 700 µm de diamètre. Le pathogène s'épanouit dans le phloème des feuilles, des branches, des racines du plant de mûrier et hiberne dans les racines. Les vecteurs (cicadelles) comme *Erythroneura mori* et *Amrasca biguttula biguttula* se nourrissent sur les plants malades et acquièrent le spiroplasma. Les cicadelles, après une incubation de deux à trois semaines, commencent à se nourrir sur des plants sains et transmettent le spiroplasma (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Zhang et coll., 2000).

Mesures de lutte :

On peut adopter les mesures de lutte suivantes pour prévenir la maladie (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Zhang et coll., 2000).

1. Il faut suivre des mesures strictes de quarantaine.
2. Il faut détruire les plants atteints en les brûlant.
3. La vaporisation d'oxytétracycline à une concentration de 0,1 % sur les plants malades peut diminuer la sévérité de la maladie.

FUTURE STRATEGIE POUR S'ATTAQUER AUX MALADIES SYSTEMIQUES

On considère les maladies systémiques comme les principales maladies en Chine, au Japon, en Corée et en Thaïlande et elles se produisent occasionnellement en Inde, au Sri Lanka et au Pakistan. Dans les pays comme le Brésil, la Thaïlande, le Népal, l'Ouzbékistan et le Vietnam, on n'a pas rapporté la présence des maladies systémiques. Comme le mûrier est une culture pérenne, une fois que les maladies des mycoplasmes / virales / des viroïdes / des spiroplasmes s'établissent sur le terrain, cela devient difficile de les supprimer, parce que les pathogènes persistent pendant toute la vie des plantes à cause de leur développement intracellulaire dans le tissu de l'hôte. Il est donc essentiel de diagnostiquer les pathogènes qui provoquent les maladies systémiques au stade initial de développement de la maladie et d'adopter une gestion appropriée pour éviter les pertes de récolte.

Comme les maladies systémiques se répandent par le matériel de plantation, il faut suivre des mesures strictes de quarantaine dans tous les pays séricicoles, lorsqu'on se procure les matériaux de plantation. Des rapports sur la classification basée sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) existent (Chen et coll., 2000) pour une meilleure évaluation des pathogènes. L'application d'outils biotechnologiques variés comme l'établissement des profils des protéines, la RAPD (ADN polymorphe amplifié de manière aléatoire), la RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction), l'AFLP (Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés), la SSR (Répétitions de séquences simples, l'ISSR (Répétitions de Séquences Intersimples) et l'EST (Marqueurs de séquences exprimées) pourrait permettre de mettre au point des méthodes précises de diagnostic / de gestion des maladies contre les infestations systémiques du mûrier.

FENOXYCARB ADMINISTRATION AND THEIR EFFECTS ON BIOLOGY OF BRAZILIAN SILKWORM STRAINS

J. E. MIRANDA¹, S.A. DE BORTOLI², R. TAKAHASHI²

¹Embrapa Algodão - Cotton National Research Center, 58107-720, Campina Grande, PB, Brazil;
²FCAV/UNESP, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil.

*In immature insects, the ecdysis process is regulated by a complex interaction between hormones of the endocrine system. The administration of products that mimic the action of these hormones can alter the regulatory process of insect growth. Juvenile hormone analogues have been tested as insect growth regulators, and they have been applied on *Bombyx mori* to evaluate the increment of the silk production. Fenoxycarb is a juvenile hormone mimic that extends the larval period of immature insects, but in excessive doses, it can disturb the processes of ecdysis and metamorphosis. The objective of this study was to determine the effects of different doses of fenoxycarb on the larval development, the silk production and the adult behaviour of the silkworm. Fenoxycarb was topically applied 48 hours after the fourth larval ecdysis, on the second thoracic segment of the insects, at doses between 0 and 100 pg a.i. Length of the fifth instar, weight gain and weights of silk glands, cocoon, cocoon shells and pupae increased by the application of up to 100 pg fenoxycarb per insect. The cocooning rate, fibroin rate, adult emergency and progeny suffered deleterious effects by fenoxycarb application, which was directly proportional to the dose.*

Keywords: JHA, larval development, silk production, adult behaviour.

INTRODUCTION

In immature insects, molting process is regulated by hormones. The *brain hormone*, produced by secretory cells in the insect's brain, acts stimulating the prothoracic glands, which answer to these stimulus by liberating α -ecdysone, that is metabolized in 20-hydroxyecdysone, which in turn acts on epidermal cells by stimulating the molting and by making them grow. Another hormone, the *juvenile hormone*, is secreted by endocrine glands known as *corpora allata*, which are located close to the brain. The presence of juvenile hormone assures that when the larva molts it will retain its larval characters and would not differentiate into an adult. The juvenile hormone is a remarkable agent which allows growth but prevents the maturation (Schneiderman and Gilbert, 1964; Riddiford, 1984).

Administration of products analogues of ecdysteroids and juvenile hormone may alter or inhibit the regulatory process of insect growth (Washida, 1984; Oshiki and Tamura, 1985; Kajiuira and Yamashita, 1989). Juvenile hormone analogues (JHA) have been tested as *Bombyx mori* growth regulators in order to obtain the increment of the silk production (Akai *et al.*, 1973, 1988; Gaaboub *et al.*, 1985; Chowdhary *et al.*, 1986, 1990; Sarangi, 1988; Cappellozza *et al.*, 1997). Akai *et al.* (1985) observed a 30% increase on the silk ratio in the control after the administration of synthetic hormone. Chang *et al.* (1972) related a 20% increase on the cocoon weight, pupal weight, beyond the formation of giant cocoons when the larvae were treated on an analogue of JHA derived from methyl-dioxy-phenyl. Chowdhary *et al.* (1986) also noticed an increase on the silk production (20%) and silk ratio (40%) with the use of juvenile hormone SJ-42-F. Subba Rao *et al.* (1988), testing the effects of topical application of methoprene, verified increases of 12,4%, 12,2%, 16,3% and 11% on the larval cocoon, shell weight, silk ratio and thread filament bave length, respectively, in relation to the control.

Fenoxycarb is a juvenile hormone mimic that, when applied in appropriate doses, promotes the prolongation of the insect last instar. During the extended period, larvae grow more than usual and could synthesize a larger amount of silk than non-treated larvae. Mamatha *et al.* (2006) found that cocoon spun by 3.0 fg/larvae fenoxycarb treated on days one and two of the fifth instar showed improved quantitative characters of cocoons and better qualitative characters of the silk over the control. Otherwise, at excessive doses, the product promotes adverse effect on the ecdysis and metamorphosis (Cappellozza *et al.*, 1990; Dedos *et al.*, 1993). The product acts inhibiting the secretory activity of the prothoracic glands at the beginning of the 5th instar, as well as the beginning of the mounting process. Its effectiveness depends on the strain and the application method (Cappellozza *et al.*, 1997). There is probably also a relationship between the concentration or type of growth regulator and the female fecundity. Gaaboub *et al.* (1985) verified that changes in the type or in the titer of juvenile hormone caused significant alterations in the number of eggs produced by female.

The purpose of this study was to determine the effects of different doses of fenoxycarb on the larval development, cocoon production and fecundity of *B. mori*.

MATERIALS AND METHODS

B. mori larvae (hybrid C115 × N108) were reared on mulberry leaves, var. FM Shima-Miura) in the Laboratory of Insect Biology Laboratory, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP, Brazil. During the fifth instar, the larvae were fed on mulberry leaves supplied *ad libitum* five times a day. No starvation period was induced. Forty eight hours after the beginning of the fifth instar, after feeding resumption, the larvae were topically treated with fenoxycarb (technical product) in doses of 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 pg active ingredient (a.i.) per insect, diluted in 5 µl of ethanol. Control larvae were treated only with the solvent. The topical applications were made on the second thoracic segment, by using a personal 100 µl computer-syringe controlled by a micro-applicator model Burkard 900-x. After the application of the product, the insects were maintained in 40 × 30 × 8 cm plastic boxes, allocated on shelves in an acclimatized chamber with controlled conditions of 14 h photophase, 26 ± 2°C and 70 ± 10% RH.

The experimental design adopted in this study was entirely randomized with six treatments (doses) and four replicates containing 25 larvae each. The appraised parameters were mortality, duration of the fifth instar, weight gain, silk gland weight, cocooning rate, cocoon weight, shell cocoon weight, pupa weight, fibroin rate, adult emergency rate and fecundity rate.

For the determination of the weight gain, daily weighing were made during the fifth instar, being interrupted in the day the larvae interrupted the feeding. The duration of the fifth instar was obtained by the difference between the beginning and the end of the instar. The beginning of the fifth instar was defined as the moment when most of the larvae restarted their movements after the ecdysis. The end of the instar was defined as the moment when most of them presented the typical behavior of the beginning of spinning (feeding end, peculiar movements, elimination of the alimentary residue).

Twenty-four hours after the feeding stopped, the silk glands were extracted from five female larvae of each replicate, randomized selected from the group of insects, forming homogeneous groups. These larvae, after having been anesthetized, were dissected in appropriate Petri's dishes, a saline solution being used (8 g NaCl; 0.4 g KCl and 0.2 g CaCl₂/1000 ml solution) in the whole process, to avoid the drying or the hydration of the material, according technique used by Takahashi (1984). Immediately after extraction, the silk glands were weighed in electronic scale.

The cocooning rate was calculated as a ratio between the number of cocoons and the initial number of larvae, in percentage.

In the twelfth day after the beginning of the cocooning, the cocoons were opened and the cocoon weight, cocoon shell weight and pupa weight were registered (in grams of fresh weight).

After the initial weighing of the cocoons, the fibroin content was obtained through cocoon cooking in hot water at 95 ± 5°C, in a solution containing 4.2 g neutral soap per liter of water, for a

period of three hours, during which the solution was replaced three times. After this, the first solution was substituted by another solution which contained 1.2 g sodium carbonate per liter of water, for a period of three hours, during which the solution was also replaced three times. It was followed by drying of the thread at 110°C for five hours. A new weighing revealed the weight of the threads, only constituted of fibroin (the sericin and sludges were eliminated in the wash). From the ratio of the fibroin weight out initial weight was obtained a value that, multiplied by 100, resulted in the fibroin rate of the silk.

The number of adults emerged in relation to the initial number of larvae was verified; therefore the adult emergency rate was obtained.

After mating, five female moths of each replicate per each treatment were placed individually in plastic recipients in order to carry out oviposition. Soon after, the eggs were weighed. In several previous tests, it was verified that a gram of eggs corresponds to approximately 1600 eggs, namely an egg weighs 0.625 mg approximately. On the egg weight basis, the number of eggs per moth was obtained.

As Brazilian silkworm strains lay hibernating eggs, a chemical treatment was made to break the dormancy of the embryos. The treatment was made with hydrochloric acid (37%), at 1.1 density, 47.5°C of temperature for six to eight minutes. Drying was done after slow wash in common water, which removed the residue of the acid, in an appropriated paper, for two hours. The eggs had the cellular segmentation stimulated by the chemical treatment, until the complete formation of the embryo. Dried eggs were placed in an incubation room, at constant temperature of 25°C, 90% humidity, 14 hours photophase, for nine days, until complete development of the embryo. In order to promote an uniform hatching of the eggs, these were then transferred to a darkroom. In the 11th day the eggs were extracted from the darkroom, beginning the hatching process. It was previously certified that the egg weight was not influenced by the application of the different doses of fenoxycarb. Thus, the eggs were weighed and the fertility rate was estimated.

The mortality was evaluated through probit analysis (Finney, 1971), through the Polo PC Computer Program (USDA Forest Service, CA, USA) and the other biological parameters were analyzed through the procedure GLM of the SAS Statistical Analyses Program, by using regression analysis to verify how each parameter was affected by the different doses of fenoxycarb.

RESULTS AND DISCUSSION

A linear regression model fitted to data of probit slope to obtain the dose-response relationship shows the increase of the mortality with the increase of the dose of fenoxycarb. The doses utilized (0.1, 1, 10, 100, 1,000 and 10,000 pg a.i. fenoxycarb/insect) cause about 0, 0, 15, 53, 89 and 100% mortality, respectively (Fig. 1). Cappellozza *et al.* (1997) verified mortality rates from 11 to 46% in case of 2.5 pg, and between 31 and 83% in case of 2,500 pg fenoxycarb, according to the sex and larval weight, in Italian strain RG36 silkworm larvae. Levels of different susceptibility seem to happen among the strains, as already observed by Gaaboub *et al.* (1985).

While normal conditions of silkworm rearing provide length of the fifth instar varying from 6 to 8 days, depending on the climatic conditions and the supplied food (Takahashi *et al.*, 2001), topical application of fenoxycarb promoted prolongation of the fifth larval instar so much more accentuated as higher was the administrated dose, resulting in an ascending curve (Fig. 2a). In ethanol-treated fifth instar duration was approximately 6 days, then cocooning period followed, while larvae treated with 100 pg fenoxycarb extended their larval period for 28 days of the fifth instar, without succeeding in metamorphosis and not even in the cocoon reported production.

This phenomenon has been reported as non-spinning syndrome and the larvae that present such a behavior are denominated 'dauer larvae' (Kajiura *et al.*, 1987; Akai *et al.*, 1988). Leonardi *et al.* (1996) registered an increase in the duration of the larval phase with doses starting from 100 fg fenoxycarb per insect and verified occurrence of 10% dauer larvae with doses above 12 pg per insect.

Although doubts still remain on the physiologic cause of the formation of 'dauer larvae', the inhibitory action of high doses of fenoxycarb on the metamorphosis of these larvae can be related with the persistence of high titers of juvenile hormone analogue in the haemolymph, impeding the production of prothoracicotropic hormone and, consequently, the molting process (Kajiura *et al.*, 1987). On base in this hypothesis, the hormonal unbalance caused by the administration of at least 100 pg fenoxycarb 48 hours after the beginning of the fifth instar resulted in the formation of 'dauer larvae'. Further, the disturbance on the insect development promoted by fenoxycarb seems to be related to the moment of application. When 1 pg fenoxycarb was applied from 0 hour until 60 hours of the 5th instar of *B. mori*, the product induced 100% dauer larvae (Dedos and Fugo, 1999a). The same dose applied at 129 or 132 h of the fifth instar larvae of the silkworm did not induce morphological abnormalities in the pupal stage, although these animals became dauer pupae (Dedos *et al.*, 2002).

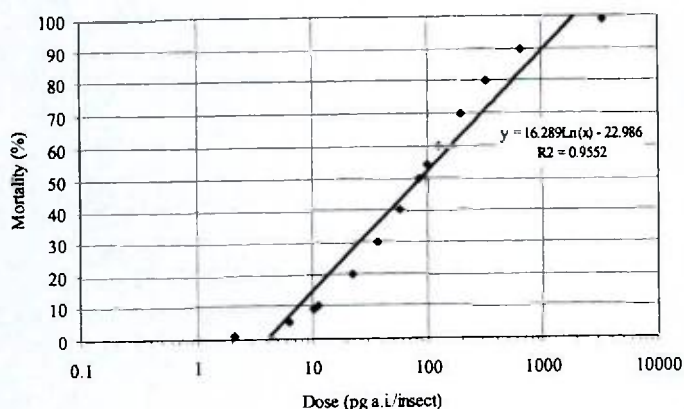


Figure 1. Mortality of *B. mori* larvae under different doses of fenoxycarb, based on the results of the probit analysis. Probit slope = $-2.806 + 1453x$; $\chi^2 = 22.634$, d.f.17, $g(0.95) = 0.11407$.

Figure 1. Mortalité de larves de *B. mori* avec différentes doses de fénoxycarbe, d'après les résultats de l'analyse probit. Courbe probit = $-2.806 + 1453x$; $\chi^2 = 22.634$, d.f.17, $g(0.95) = 0.11407$.

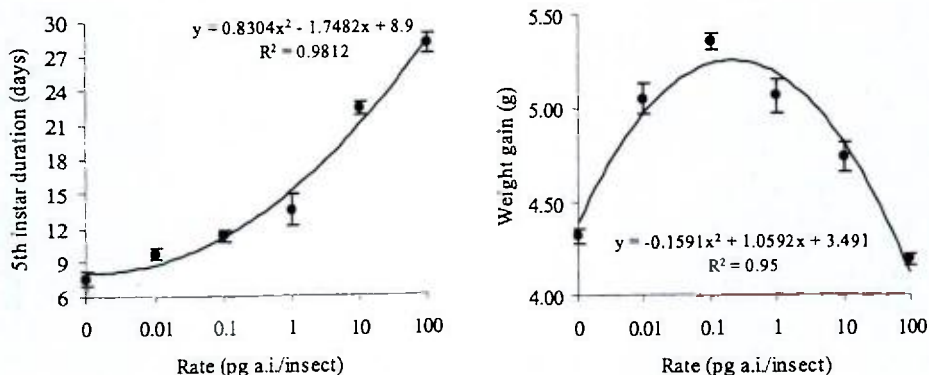


Figure 2. Effect of fenoxycarb on *B. mori*. a) fifth instar duration and b) weight gain.

Figure 2. Effet du fénoxycarbe sur a) la durée du cinquième âge et b) le gain de poids de *B. mori*.

The weight gain of the larvae varied with the dose following a quadratic model, increasing with the increment of the dose of fenoxycarb until 0.1 pg and decreasing with higher doses (Fig. 2b). This behavior can be explained by the fact that the insects cannot exceed the critical weight for the metamorphosis, it means, the weight considered as limit and genetically determined for each strain (Cappellozza *et al.*, 1995), even with the increase of the dose, which, on the contrary, promotes metabolic disturbances and even the 'non-spinning syndrome'. Assal *et al.* (1994) demonstrated that, although the final weight of larvae treated with fenoxycarb is superior to the final weight of non-treated larvae, the growth rates were smaller in the larvae exposed to the product than in those non exposed ones. Gaaboub *et al.* (1985) verified that the feeding rhythm and the efficiency of conversion of the ingested food were reduced with application of JHA.

The tendency of variation of the silkglad weight in function of the applied dose of fenoxycarb were similar to what was verified with the weight gain of the larvae, presenting a quadratic model in the response, suggesting that the amount of food used for the growth of the silkglads was proportional to the total assimilated food amount (Fig. 2b and 3a). According to Prudhomme *et al.* (1985), the silkglads are tissues influenced by the juvenile hormone, because soon after the treatment with the JHA, the growth of these glands suffers an inhibition while the other organs continue to grow as in the non-treated insects; after this, a hypertrophy of the silkglad is observed. This effect is increased with the increment of the dose, until a dose-limit, starting from which the product becomes deleterious. In the case of fenoxycarb, 0.1 pg was shown as dose-limits for the Brazilian strain of silkworm.

The cocooning was negatively affected by the administration of fenoxycarb, and as larger the dose, smaller was the cocooning rate (Fig. 3b). On the one hand, the extended duration of the fifth instar due to the application of growing doses of fenoxycarb promoted, until certain limits, gradual increase in the body and silkglad weight but the survival rate was smaller and smaller, due to the occurring metabolic disturbances, resulting in a gradually decreasing cocooning rate in an inverse proportion of the dose. According to Novák (1966), several metabolic processes are influenced by the juvenile hormone besides the inhibition of the metamorphosis, as alterations in the synthesis of proteins, oxygen consumption, nitrogen and enzymes metabolism.

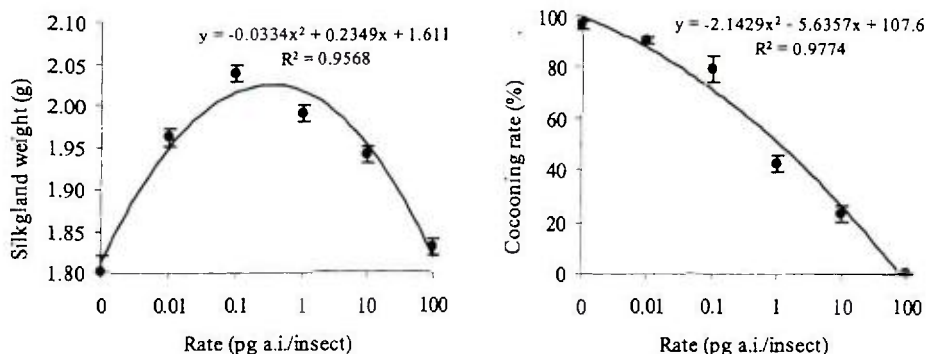


Figure 3. Effect of fenoxycarb on *B. mori* a) silkglad weight and b) cocooning rate.

Figure 3. Effet du fénoxycarbe sur a) le poids de la glande séricigène et sur b) le taux de coconnage de *B. mori*.

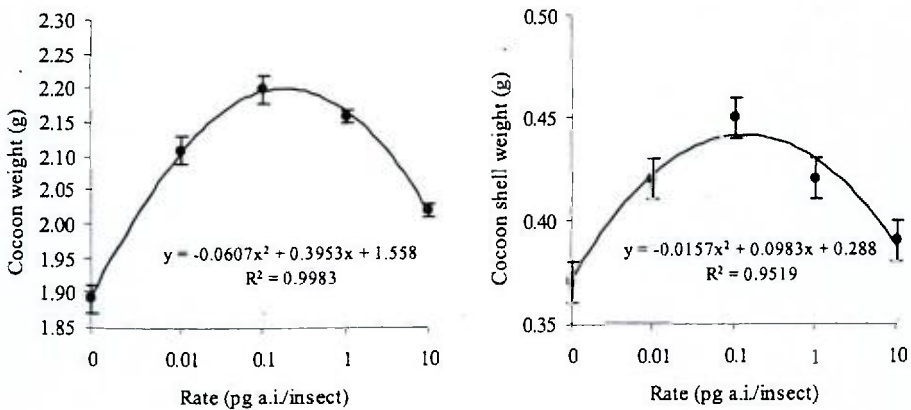


Figure 4. Effect of fenoxycarb on *B. mori* a) cocoon weight and b) cocoon shell weight.

Figure 4. Effet du fénoxycarbe sur a) le poids du cocon et sur b) le poids de la coque soyeuse de *B. mori*.

The silk production was increased by the application of doses up to 0.1 pg fenoxycarb, when it reached the maximum point of cocoon weights, shell cocoons and pupae weight (Fig. 4a, 4b and 5a). From this point, a decline was verified for the three parameters, also demonstrating inhibitory action of fenoxycarb on the silk production. These results allow agreeing partly with Chowdhary *et al.* (1986), which affirmed that cocoon weight is proportional to the titer of JHA and the duration of the feeding period. In fact, until a dose-limit this relationship was verified; after this, however, the product was shown deleterious to the silk production. Similar behaviors were verified in the dose-response relationships for cocoon weights, cocoon shell and pupal weight, suggesting that the products assimilated by the insects during the larval phase were distributed in a proportional way for the silk production and the corporal constitution of the pupa. The extra production of silk caused by JHA is due to the hypertrophy of the silk glands and the concomitant increase in the RNA content (Kurata and Daillie, 1978; Subba Rao *et al.*, 1988).

The silk thread produced by the silk glands contains about 96% proteins, divided into fibroin (73%) and sericin (23%) (Takahashi *et al.*, 2001). In the industrial process of cocoon improvement, the sericin is solubilized through thermal-hydric treatment, the fibroin remaining as main component of the silk. The fibroin amount present in the cocoons of fenoxycarb treated larvae tended to decrease as the dose increased, indicating that the administration of fenoxycarb in the silkworm larvae is harmful to the process of synthesis of protein, this effect being intensified as the dose is increased (Fig. 5b). These results corroborate Sarangi (1988), studying the effects of methoprene on the silk gland, which verified decreases in the fibroin content when the product was applied at chronic doses on the silkworm. As ecdysterone plays an important role on fibroin synthesis (Shigematsu and Moriyama, 1970), the action of juvenile hormone analogues, like fenoxycarb and methoprene, avoiding or delaying secretion of ecdysterone, affects negatively the fibroin production.

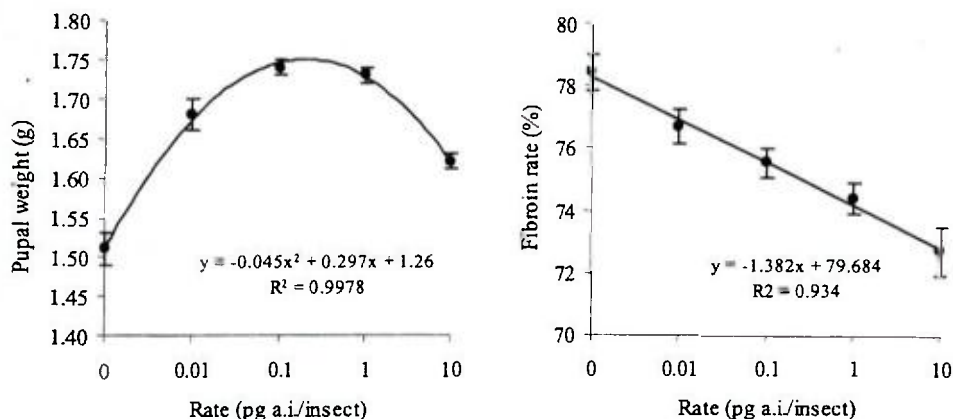


Figure 5. Effect of fenoxycarb on *B. mori* a) pupal weight and b) fibroin rate.

Figure 5. Effet du fénoxycarbe sur a) le poids nymphal et sur b) le taux de fibroïne de *B. mori*.

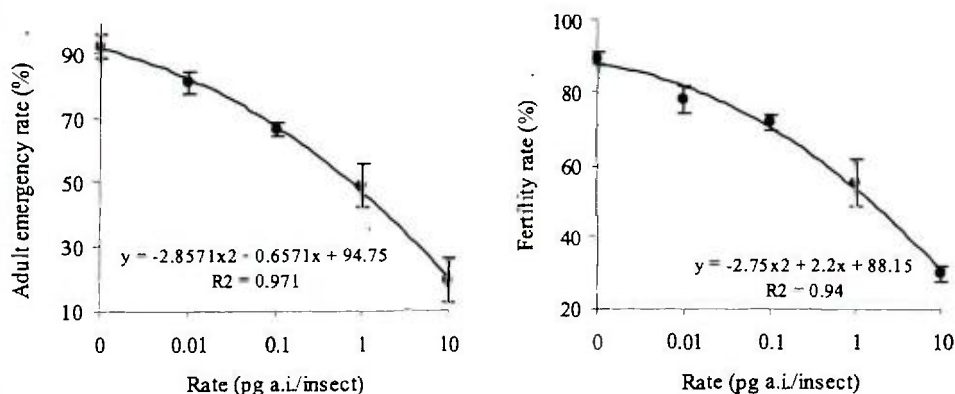


Figure 6. Effect of fenoxycarb on *B. mori* a) adult emergence and b) fertility rate.

Figure 6. Effet du fénoxycarbe sur a) l'émergence des adultes et sur b) le taux de fécondité de *B. mori*.

Fenoxycarb effects on the adult phase of silkworms were also verified. The adult emergence was negatively affected by the fenoxycarb application in the larval phase, starting from the minimum dose (Fig. 6a). Previous works presented similar results in *B. mori* (Dedos *et al.*, 1993; Dedos and Fugo,

1999b). According to these authors, high fenoxycarb levels in the haemolymph were responsible for the fall in the adult emergency rate. Fenoxycarb interference in the adults emergency in other species of insects has also been reported, as in *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Edwards and Abraham, 1985), *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Dhadialla *et al.*, 1998), *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) (Liu and Chen, 2001) e *Helicoverpa armigera* (Rafaeli and Bober, 2005).

In the same way, the fertility was affected by fenoxycarb, decreasing as the applied dose was increased (Fig. 6b). These results agree with those obtained by Dedos *et al.* (1993), which considered that the ovarian development was suppressed by fenoxycarb due to their slow degradation in the insect haemolymph. Dedos and Fugo (1999a) reported that fenoxycarb treatment before and after pupal ecdysis of *B. mori* disturbed adult eclosion and the insects were unable to escape from the pupal exuviae. According to the authors, this effect of fenoxycarb was dose and time dependent with the highest sensitivity around the pupal ecdysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly indebted to FAPESP for a post-graduate fellowship (Proc. n. 97/13659-6) and for financial support of this work.

REFERENCES

- AKAI H., KIGUCHI K., MORI K. (1973) The influence of juvenile hormone on the growth and metamorphosis of *Bombyx* larvae. Bull. Seric. Exp. Stn. Japan 25: 287-305.
- AKAI H., TAKABAYASHI K., KIUCHI M. (1988) Induction of spinning from JH-treated larvae of *Bombyx mori* by ecdysteroid administration. J. Seric. Sci. Japan, 57: 341-344.
- AKAI H., KIMURA K., KIGUCHI A. SHIBUKAWA A. (1985) Increase of silk production by repeated treatment with a juvenile hormone analogue. J. Seric. Sci. Japan, 54: 297-299.
- ASSAL O.M., BENEDETTI R., CAPPELLOZZA L., CAPPELLOZZA S. (1994) The nutritional behaviour of three different races of mulberry silkworm (*Bombyx mori*) in relation to Insegar (fenoxycarb). Sericologia 34: 233-243.
- CAPPELLOZZA L., CAPPELLOZZA S., SBRENNNA G. (1995) Changes in the developmental programme of *Bombyx mori* caused by oral treatment with fenoxycarb during the last larval instar. Sericologia 35: 427-436.
- CAPPELLOZZA L., IANNE P., CAPPELLOZZA S. (1997) Effect of body weight on effectiveness of the insect growth regulator (I.G.R.) fenoxycarb applied to the male and female silkworm (*Bombyx mori*) (Lepidoptera: Bombycidae). Sericologia 37: 443-452.
- CAPPELLOZZA L., MIOTTO F., MORETTO E. (1990) Effetti del fenoxycarb a basse concentrazioni sulle larve di *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Redia 73: 517-529.
- CHANG C.F., MURAKOSHI S., TAMURA S. (1972) Giant cocoon formation in the silkworm, *Bombyx mori* L. topically treated with methylenedioxyphephenyl derivatives. Agric. Biol. Chem. 36: 629-694.
- CHOWDHARY S.K., RAJU R.S., OGRA, S. 1990. Effect of JH analogues on silkworm, *Bombyx mori* L., growth and development of silk gland. Sericologia 30: 155-165.
- CHOWDHARY S.K., SEHNAL F., RAJ S.K., RAJU P.S., MATHU S. (1986) Giant cocoon formation in *Bombyx mori* L. topically treated with juvenile hormone SJ-42-F. Sericologia 26: 455-459.
- DEDOS S., FUGO H. (1999a) Disturbance of adult eclosion by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Phys. 45:257-264.
- DEDOS S., FUGO H. (1999b) Induction of dauer larvae by application of fenoxycarb early in the 5th instar of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 45: 769-775.
- DEDOS S., ASAHINA, M., FUGO H. (1993) Effect of fenoxycarb application on the pupal-adult development of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan 62: 276-285.

- DEDOS S., SZURDOKI F., SZÉKÁCS A., MIZOGUCHI A., FUGO H. (2002) Induction of dauer pupae by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 48: 857-865.
- DHADIALLA T.S., CARLSON G.R., LE D.P. (1998) New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu. Rev. Entomol. 43: 545-569.
- EDWARDS J.P., ABRAHAM L. (1985) Laboratory evaluation of two insect juvenile hormone analogues against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Stored Prod. Res. 21: 189-164.
- FINNEY, D.J. (1971) Probit analysis. Cambridge Univ. Press, England, 356p.
- GAABOUBI A., EL-HELALY M.S., MOSTAFA S.M. (1985) Food utilization, rate of larval growth, and fecundity of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) fed mulberry leaves treated with methoprene, triprene, and diflubenzuron. J. Econ. Entomol., 78: 1182-1186.
- KAJIURA Z., YAMASHITA O. (1989) Super growth of silk glands in the dauer larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, induced by a juvenile hormone analogue. J. Seric. Sci. Japan, 58: 39-46.
- KAJIURA Z., KADONO-OKUDA K., YAMASHITA O. (1987) Induction of dauer larvae by a juvenile hormone analogue and their response to ecdysteroids in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 56: 398-406.
- KURATA K., DAILLIE J. (1978) Effect of exogenous juvenoid on the growth of the silk gland and the synthesis of nucleic acid and silk protein by the silk gland of *Bombyx mori*. Bull. Seric. Exp. Stn. Japan 27: 507-530.
- LIU T.X., CHEN T.Y. (2001) Effects of the insect growth regulator fenoxycarb on immature *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). Florida Entom. 84: 628-633
- LEONARDI M.G., CAPPELLOZZA S. IANNE P., CAPPELLOZZA L., PARENTI P., GIORDANA B. (1996) Effects of the topical application of an insect growth regulator (fenoxycarb) on some physiological parameters in the fifth instar larvae of the silkworm *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. 113: 361-365.
- MAMATHA D.M., COHLY H.P.P., RAJU A.H.H., RAO R. (2006) Studies on the quantitative and qualitative characters of cocoons and silk from methoprene and fenoxycarb treated *Bombyx mori* (L.) larvae. African J. Biotech. 5: 1422-1426.
- NOVÁK V.J.A. (1966). Insect hormones. 1st ed., London, Methuen, 478p.
- OSHIKI T., TAMURA H. (1985). Changes in the pattern of molting associated with the administration of a juvenoid to the early instar larva of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 54: 138-142.
- PRUDHOMME J.C., COUBLE P., GAREL J.P., DAILLIE J. (1985) Silk synthesis, p.371-395. In G.A. Kerkut, L.I. Gilbert (eds, Comprehensive Insect Physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford, Pergamon Press, 687p.
- RAFAELI A., BOBER R. (2005) The effect of the juvenile hormone analog, fenoxycarb on the PBAN-receptor and pheromone production in adults of the moth *Helicoverpa armigera*: an "aging" hormone in adult females? J. Insect Physiol. 51: 401-410.
- RIDDIFORD L.M. (1984) Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. Adv. Insect Physiol. 24: 131-146.
- SARANGI S.K. (1988) Effect of juvenile hormone analogue on the silk gland of the silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia 28: 553-557.
- SCHNEIDERMAN H.A., GILBERT L.I. (1964) Control of growth and development in insects. Science 143: 325-333.
- SHIGEMATSU H., MORIYAMA H. (1970) Effect of ecdysterone on fibroin synthesis in the posterior division of the silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 16: 2015-2022.
- SUBBA RAO G., DAS S.K., SEN S.K., NANDI S., SOMPOMU R. (1988) A study on the effect of a juvenile hormone analogue on the bivoltine silkworm, *B. mori* L. Sericologia 28: 543-564.
- TAKAHASHI R., TAKAHASHI K.M., TAKAHASHI L.S. (2001) Sericicultura: uma promissora exploração agropecuária. Jaboticabal: Editora Funep. 126p.
- WASHIDA S. (1984) Influence of juvenile hormone analogues applied at fourth instar on larval growth and cocoon weight in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 53: 210-215.

ADMINISTRATION DE FÉNOXYCARBE ET EFFETS SUR LA BIOLOGIE DES SOUCHES DE VERS À SOIE BRÉSILIENS

J. E. MIRANDA¹, S. A. DE BORTOLI², R. TAKAHASHI²

1. Embrapa Algodão – Cotton National Research Center, 58107-720, Campina Grande, PB, Brésil
2. FCAV / UNESP, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brésil.

*Chez les insectes immatures, le processus de l'ecdysis est régulé par une interaction complexe entre les hormones du système endocrine. L'administration de produits qui miment l'action de ces hormones peut altérer le processus régulateur de la croissance de l'insecte. On a testé les analogues d'hormone juvénile comme régulateurs de la croissance des insectes et ils ont été appliqués chez **Bombyx mori** pour évaluer l'augmentation de la production de soie. Le fénoxycarbe est un mimétique de l'hormone juvénile qui rallonge la durée larvaire des insectes immatures, mais en doses excessives il peut déranger les processus de l'ecdysis et de la métamorphose. L'objectif de cette étude est de déterminer les effets des différentes doses de fénoxycarbe sur le développement larvaire, la production de soie et le comportement adulte du ver à soie. On applique le fénoxycarbe localement 48 h après la quatrième ecdysis larvaire, sur le deuxième segment thoracique des insectes à des doses entre 0 et 100 pg a.i. La durée du 5^{ème} âge, le gain de poids et les poids des glandes séricigènes, du cocon, des coques soyeuses et des nymphes augmentent avec l'application de fénoxycarbe jusqu'à 100 pg par insecte. Le taux de coconnage, le taux de fibroïne, l'émergence des adultes et de la descendance subissent des effets négatifs avec l'application de fénoxycarbe, qui sont directement proportionnels à la dose.*

INTRODUCTION

Chez les insectes immatures, le processus de mue est régulé par les hormones. L'hormone du cerveau, produite par les cellules sécrétrices dans le cerveau de l'insecte, agit en stimulant les glandes prothoraciques, qui répondent à ce stimulus en libérant de l' α -ecdysone, qui est métabolisée dans la 20-hydroxyecdysone, qui à son tour agit sur les cellules épidermiques en stimulant la mue et en les faisant croître. Une autre hormone, l'hormone juvénile, est sécrétée par les glandes endocrines, connues comme les *corpora allata*, qui sont localisées près du cerveau. La présence de l'hormone juvénile fait en sorte que quand la larve mue, elle retient ses caractères larvaires et ne se différencie pas en adulte. L'hormone juvénile est un agent remarquable qui permet la croissance mais empêche la maturation (Schneiderman et Gilbert, 1964 ; Riddiford, 1984).

L'administration de produits analogues d'ecdystéroïdes et d'hormone juvénile altère ou inhibe le processus régulateur de la croissance de l'insecte (Washida, 1984 ; Oshiki et Tamura, 1985 ; Kajiuira et Yamashita, 1989). On a testé les analogues d'hormone juvénile (JHA) comme régulateurs de la croissance de *Bombyx mori*, dans le but d'obtenir une augmentation de la production de soie (Akai et coll., 1973 ; 1988 ; Gaaboub et coll., 1985 ; Chowdhary et coll., 1986, 1990 ; Sarangi, 1988 ; Cappellozza et coll., 1997). Akai et coll., (1985) ont observé une augmentation de 30 % de la richesse soyeuse, après l'administration de l'hormone de synthèse. Chang et coll., (1972) ont signalé une augmentation de 20 % du poids du cocon, du poids de la nymphe, au-delà de la formation de cocons géants, quand on traite les larves avec un analogue de JHA tiré du méthyl-dioxy-phényl. Chowdhary et coll., (1986) ont aussi remarqué une augmentation de la production de soie (20 %) et de la richesse soyeuse (40 %), avec l'utilisation de l'hormone juvénile SJ-42-F. Subba Rao et coll., (1988), en testant les effets de l'application topique de méthoprène, ont vérifié des augmentations du poids du cocon,

de la larve, du poids de la coque, de la richesse soyeuse et de la longueur du filament de la bave de respectivement 12,4 % ; 12,2 % ; 16,3 % et 11 %, par rapport au témoin.

Le fénoxycarbe est un mimétique de l'hormone juvénile qui, quand on l'applique à des doses appropriées, favorise le prolongement du dernier âge de l'insecte. Pendant le prolongement de la période, les larves croissent plus que d'habitude et peuvent synthétiser une plus grande quantité de soie que les larves non traitées. Mamatha et coll., (2006) ont constaté que le cocon filé par les larves traitées avec 3 fg / larve de fénoxycarbe le premier et le deuxième jour du 5^{ème} âge, présente une amélioration des caractères quantitatifs et de meilleurs caractères qualitatifs de la soie par rapport au témoin. Autrement, à des doses excessives, le produit présente un effet négatif sur l'ecdysis et la métamorphose (Cappelozza et coll., 1990 ; Dedos et coll., 1993). Le produit agit en inhibant l'activité sécrétrice des glandes prothoraciques au début du 5^{ème} âge, ainsi que le processus de montée. Son efficacité dépend de la dose et de la méthode d'application (Cappelozza et coll., 1997). Il existe probablement aussi une relation entre la concentration ou le type de régulateur de croissance et la fécondité de la femelle. Gaaboub et coll., (1985) ont confirmé que les changements du type ou de la teneur en hormone juvénile entraînent des changements significatifs du nombre d'œufs produits par la femelle.

Le but de cette étude est de déterminer les effets de différentes doses de fénoxycarbe sur le développement larvaire, sur la production de cocons et sur la fécondité de *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

On élève les larves de *B. mori* (hybride C115 × N108) sur des feuilles de mûrier, var. FM Shima-Miura au Laboratoire de Biologie des Insectes, *Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista*, Campus de Jaboticabal, SP, Brésil. Pendant le 5^{ème} âge, on nourrit les larves sur des feuilles de mûrier fournies *ad libitum* cinq fois par jour. Cela n'induit pas de période sans prise d'alimentation. Quarante huit heures après le début du cinquième âge, après la reprise de l'alimentation, on traite les larves de manière topique avec du fénoxycarbe (produit technique) en doses de 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 et 100 pg d'ingrédient actif (a.i) par insecte, dilué dans 5 µl d'éthanol. On traite les larves témoins seulement avec le solvant. On procède aux applications topiques sur le deuxième segment thoracique, en utilisant une seringue de 100 µl, contrôlée par un micro applicateur du modèle Burkard 900-x. Après l'application du produit, on maintient les insectes dans des boîtes en plastique de 40 × 30 × 8cm, placées sur des étagères dans une pièce climatisée avec des conditions contrôlées de 14 h de photophase, 26 ± 2° C et 70 ± 10 % d'HR.

La conception de l'expérience adoptée dans cette étude est entièrement aléatoire avec six traitements (doses) et quatre répétitions de 25 larves chacune. Les paramètres évalués sont la mortalité, la durée du 5^{ème} âge, le gain de poids, le poids de la glande séricigène, le taux de coconnage, le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse, le poids de la nymphe, le taux de fibroïne, le taux d'émergence des adultes et le taux de fécondité.

Pour la détermination du gain de poids, on procède à la pesée quotidienne pendant le 5^{ème} âge, qui s'interrompt le jour où les larves arrêtent de se nourrir. On obtient la durée du 5^{ème} âge d'après la différence entre le début et la fin de l'âge. On définit le commencement du 5^{ème} âge comme le moment quand la plupart des larves recommencent leurs mouvements après l'ecdysis. On définit la fin de l'âge comme le moment où la plupart d'elles présentent le comportement typique de commencement du filage (arrêt de l'alimentation, mouvements particuliers, élimination des résidus alimentaires).

Vingt quatre heures après l'arrêt de l'alimentation, on extrait les glandes séricigènes de cinq larves femelles de chaque répétition, sélectionnées au hasard dans les groupes d'insectes formant des groupes homogènes. On dissèque ces larves dans des boîtes de Petri, après les avoir anesthésiées, en utilisant une solution saline (8g NaCl ; 0,49 KCl et 0,2 g CaCl₂ / 1000 ml de solution) pendant tout le processus, pour éviter le dessèchement ou l'hydratation du matériel, selon la technique utilisée par

Takahashi (1984). Immédiatement après leur extraction, on pèse les glandes séricigènes sur une balance électronique.

On calcule le taux de coconnage comme le ratio entre le nombre de cocons et le nombre initial de larves, en pourcentage.

Le douzième jour après le commencement du coconnage, on ouvre les cocons et on enregistre le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse et le poids de la nymphe (en grammes de poids frais).

Après la pesée initiale des cocons, on obtient la teneur en fibroïne en cuisant les cocons dans de l'eau chaude à $95 \pm 5^\circ \text{C}$, dans une solution contenant 4,2 g de savon neutre par litre d'eau pendant une période de trois heures, pendant laquelle on remplace la solution trois fois. Après cela, on remplace la première solution par une autre solution, qui contient 1,2 g de carbonate de sodium par litre d'eau pendant une durée de trois heures, pendant laquelle la solution est aussi remplacée trois fois. Puis on sèche le fil à 110°C pendant cinq heures. Une nouvelle pesée donne le poids des fils, seulement constitués de fibroïne (la sérécine et les impuretés sont éliminées au lavage). D'après le ratio entre le poids de la fibroïne et le poids initial, on obtient une valeur, qui multipliée par 100, donne le taux de fibroïne de la soie.

On vérifie le nombre d'adultes qui émergent par rapport au nombre de larves initiales et on obtient donc le taux d'émergence des adultes.

Après l'accouplement, on place cinq papillons femelles de chaque répétition pour chaque traitement, individuellement dans des récipients en plastique pour procéder à la ponte. Peu après, on pèse les œufs. Dans plusieurs tests antérieurs, on avait vérifié qu'un gramme d'œufs correspond à approximativement à 1600 œufs, à savoir qu'un œuf pèse approximativement 0,625 mg. Sur la base du poids des œufs, on obtient le nombre d'œufs par papillon.

Comme les souches de vers à soie brésiliennes pondent des œufs à diapause, on procède à un traitement chimique pour rompre la dormance des embryons. On procède au traitement avec de l'acide chlorhydrique (37 %), à une densité de 1,1, une température de $47,5^\circ \text{C}$ pendant six à huit minutes. Après les avoir lentement lavés à l'eau courante pour enlever les résidus d'acide, on les sèche sur du papier approprié pendant deux heures. Les œufs ont une segmentation cellulaire stimulée par le traitement chimique, jusqu'à la formation complète de l'embryon. On place les œufs secs dans une pièce d'incubation à une température constante de 25°C , une humidité de 90 %, une photophase de 14 heures, pendant neuf jours jusqu'au développement complet de l'embryon. Pour promouvoir une éclosion uniforme des œufs, on les transfère ensuite dans une pièce sombre. Le 11^{ème} jour, on sort les œufs de la pièce sombre, ce qui fait démarrer le processus d'éclosion. Il a déjà été prouvé que le poids de l'œuf n'est pas influencé par l'application de différentes doses de fénoxycarbe. On pèse donc les œufs et on estime le taux de fertilité.

On évalue le taux de mortalité par l'analyse probit (Finney, 1971), grâce au Programme Informatique Polo PC (USDA Forest Service, CA, USA) et on analyse les autres paramètres biologiques selon la procédure GLM du Programme d'Analyse Statistique SAS, en utilisant une analyse de régression pour vérifier comment chaque paramètre est affecté par les différentes doses de fénoxycarbe.

RESULTATS ET DISCUSSION

On adapte un modèle de régression linéaire par rapport aux données de la pente probit pour obtenir la relation entre la dose et la réponse, qui montre une augmentation de la mortalité avec l'augmentation de la dose de fénoxycarbe. Les doses utilisées (0,1 ; 1, 10, 100, 1000 et 10 000 pg a.i de fénoxycarbe / insecte) provoquent respectivement environ 0, 0, 15, 53, 89 et 100 % de mortalité (Fig. 1). Cappelozza et coll., (1997) ont vérifié des taux de mortalité de 11 à 46 % avec 2,5 pg et entre 31 et 83 % avec 2500 pg de fénoxycarbe, selon le sexe et le poids larvaire, chez les larves de vers à soie de la souche italienne RG36. Des niveaux de sensibilité différente semblent se produire entre les souches, comme l'ont déjà observé Gaaboub et coll., (1985).

Tandis que des conditions normales d'élevage du ver à soie font durer le cinquième âge de 6 à 8 jours selon les conditions climatiques et la nourriture apportée (Takahashi et coll., 2001), l'application topique de fénoxycarbe favorise le prolongement de la durée du cinquième âge larvaire, qui est beaucoup plus long plus la dose administrée est élevée, ce qui donne une courbe ascendante (Fig. 2a). Avec un traitement à l'éthanol, la durée du cinquième âge est d'approximativement 6 jours, puis suit la période du coconnage, tandis que la durée du cinquième âge larvaire des larves traitées avec 100 pg de fénoxycarbe s'allonge à 28 jours, sans qu'elles réussissent leur métamorphose, même par rapport à la production de cocons signalée.

Ce phénomène a été signalé comme le syndrome de non filage et on appelle les larves qui présentent ce comportement des « larves permanentes » (Kajiura et coll., 1987 ; Akai et coll., 1988). Leonardi et coll., (1996) ont enregistré une augmentation de la durée larvaire avec des doses commençant à partir de 100 fg de fénoxycarbe par insecte et ils ont vérifié la présence de 10 % de larves permanentes avec des doses au-dessus de 12 pg par insecte. Bien qu'il reste des doutes sur la cause physiologique de la formation de « larves permanentes », on peut associer l'action inhibitrice de doses élevées de fénoxycarbe par rapport à la métamorphose de ces larves à la persistance de teneurs élevées d'analogue d'hormone juvénile dans l'hémolymphe, ce qui empêche la production de l'hormone prothoracicotropique et en conséquence, du processus de mue (Kajiura et coll., 1987). Sur la base de cette hypothèse, le déséquilibre hormonal provoqué par l'administration d'au moins 100 pg de fénoxycarbe 48 heures après le commencement du cinquième âge, entraîne la formation de « larves permanentes ». De plus, le dérèglement du développement de l'insecte provoqué par le fénoxycarbe semble être lié au moment de l'application. Quand on applique 1 pg de fénoxycarbe pendant le 5^{ème} âge de *B. mori* de 0 à 60 heures, le produit induit 100 % de larves permanentes (Dedos et Fugo, 1999a). La même dose appliquée de la 129^{ème} à la 132^{ème} heure chez les larves du cinquième âge du ver à soie n'induit pas d'anomalies morphologiques pendant le stade nymphal, bien que ces animaux deviennent des nymphes permanentes (Dedos et coll., 2002).

Le gain de poids des larves varie avec la dose, suivant un modèle quadratique, augmentant avec l'augmentation de la dose de fénoxycarbe jusqu'à 0,1 pg et baissant avec des doses plus élevées (Fig. 2b). On peut expliquer ce comportement par le fait que les insectes ne peuvent pas dépasser un poids critique pour la métamorphose, ce qui signifie un poids considéré comme limite et déterminé génétiquement pour chaque souche (Cappelozza et coll., 1995), même avec l'augmentation de la dose qui, au contraire favorise des dérangements métaboliques et même « le syndrome de non filage ». Assal et coll., (1994) ont démontré que, bien que le poids final des larves traitées avec du fénoxycarbe soit supérieur au poids final des larves non traitées, les taux de croissance des larves exposées au produit sont plus faibles que ceux des larves non exposées. Gaaboub et coll., (1985) ont confirmé que le rythme d'alimentation et l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée diminuent avec l'application de JHA.

La tendance de variation du poids de la glande séricigène, en fonction de la dose de fénoxycarbe appliquée, est similaire à celle observée pour le gain de poids des larves et présente un modèle de réponse quadratique, ce qui suggère que la quantité de nourriture utilisée pour la croissance des glandes séricigènes est proportionnelle à la quantité totale de nourriture assimilée (Fig. 2b et 3a). Selon Prudhomme et coll., (1985), les glandes séricigènes sont des tissus influencés par l'hormone juvénile, parce que peu après le traitement avec la JHA, la croissance de ces glandes subit une inhibition, tandis que les autres organes continuent à croître comme chez les insectes non traités ; après cela, on observe une hypertrophie de la glande séricigène. Cet effet augmente avec l'augmentation de la dose jusqu'à une dose limite, à partir de laquelle le produit devient néfaste. Dans le cas du fénoxycarbe, 0,1 pg s'avère comme la dose limite pour les souches brésiliennes du ver à soie.

L'administration de fénoxycarbe a un effet négatif sur le coconnage et plus la dose est grande, plus le taux de coconnage est faible (Fig. 3b). D'autre part, le prolongement de la durée du 5^{ème} âge, à cause de l'application de doses croissantes de fénoxycarbe promeut, jusque dans certaines limites,

une augmentation progressive du poids du corps et de la glande séricigène, mais le taux de survie est de plus en plus faible en raison des dérangements métaboliques qui se produisent, ce qui entraîne une baisse progressive du taux de coconnage dans une proportion inverse à la dose. Selon Novak (1966), en plus de l'inhibition de la métamorphose, plusieurs processus métaboliques sont influencés par l'hormone juvénile, comme les altérations de la synthèse des protéines, de la consommation d'oxygène, d'azote et du métabolisme de l'azote.

La production de soie augmente avec l'application de doses jusqu'à 0,1 pg de fénoxycarbe, où elle atteint le niveau maximum pour les poids du cocon, poids de la coque soyeuse et poids des nymphes (Fig. 4a, 4b et 5a). À partir de ce niveau, on enregistre un déclin pour les trois paramètres, ce qui montre aussi l'action inhibitrice du fénoxycarbe par rapport à la production de soie. Ces résultats concordent partiellement avec ceux de Chowdhary et coll., (1986), qui ont affirmé que le poids du cocon est proportionnel à la teneur en JHA et à la durée de la période d'alimentation. En fait, cette relation est vérifiée jusqu'à une dose limite ; après cela, cependant, le produit s'avère néfaste pour la production de soie. On a vérifié des comportements similaires en ce qui concerne la relation entre la réponse et la dose, pour le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse et le poids de la nymphe, ce qui suggère que les produits assimilés par les insectes pendant la phase larvaire sont distribués de manière proportionnelle pour la production de soie et pour la constitution corporelle de la nymphe. La production supplémentaire de soie provoquée par la JHA est due à l'hypertrophie des glandes séricigènes et à l'augmentation parallèle de la teneur en ARN (Kurata et Daillie, 1978 ; Subba Rao et coll., 1988).

Le fil de soie produit par les glandes séricigènes produit environ 96 % de protéines, divisées entre la fibroïne (73 %) et la sérécine (23 %) (Takahashi et coll., 2001). Dans le processus industriel d'amélioration du cocon, la sérécine est solubilisée par un traitement thermo-hydrique, la fibroïne restant le composant principal de la soie. La quantité de fibroïne présente dans les cocons des larves traitées au fénoxycarbe tend à diminuer lorsque la dose augmente, ce qui indique que l'administration de fénoxycarbe chez les larves de vers à soie nuit au processus de synthèse de la protéine, cet effet s'intensifiant quand on augmente la dose (Fig. 5b). Ces résultats corroborent ceux de Sarangi (1988), qui a étudié les effets du méthoprène sur la glande séricigène et enregistré des baisses de la teneur en fibroïne quand on applique le produit en doses chroniques chez le ver à soie. Comme l'ecdystérone joue un rôle important dans la synthèse de la fibroïne (Shigematsu et Moriyama, 1970), l'action d'analogues de l'hormone juvénile comme le fénoxycarbe et le méthoprène, qui évitent ou retardent la sécrétion d'ecdystérone, a un effet négatif sur la production de fibroïne.

On a aussi vérifié les effets du fénoxycarbe sur la phase adulte des vers à soie. L'application de fénoxycarbe pendant la phase larvaire a un effet négatif sur l'émergence des adultes, à partir de la dose minimum (Fig. 6 a). Des travaux antérieurs ont présenté des résultats similaires chez *B. mori* (Dedos et coll., 1993 ; Dedos et Fugo, 1999b). Selon ces auteurs, des niveaux élevés de fénoxycarbe dans l'hémolymphe sont responsables de la baisse du taux d'émergence des adultes. On a aussi signalé l'interférence du fénoxycarbe dans l'émergence des adultes chez d'autres espèces d'insectes, comme chez *Alphitobius diaperinus* (Coléoptères : Tenebrionidae) (Edwards et Abraham, 1985), *Spodoptera litura* (Lépidoptères : Noctuidae) (Dhadialla et coll., 1998), *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptères : Chrysopidae) (Liu et Chen, 2001) et *Helicoverpa armigera* (Rafaeli et Bober, 2005).

De la même manière, le fénoxycarbe a un effet négatif sur la fertilité, qui baisse alors que la dose appliquée augmente (Fig. 6b). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Dedos et coll., (1993), qui ont estimé que le fénoxycarbe inhibe le développement ovarien en raison de sa lente dégradation dans l'hémolymphe de l'insecte. Dedos et Fugo (1999a) ont signalé que le traitement au fénoxycarbe avant et après l'ecdysis nymphale de *B. mori* déränge l'éclosion des adultes et les insectes sont incapables de sortir de l'exuvie nymphale. Selon les auteurs, cet effet du fénoxycarbe dépend de la dose et du moment, avec la sensibilité la plus importante autour de l'ecdysis nymphale.

CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS INFECTING THE OAK TASAR SILKWORM, *ANTHRAEA PROYLEI* JOLLY (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE)

L. REETA, T. JAMES KEISA, K. CHAOBA SINGH & R. VARATHARAJAN^{1*}

Regional Tasar Research Station, Mantripukri, Imphal - 795 002, Manipur, India.
1 Department of Life Sciences, Manipur University, Imphal - 795 003, Manipur, India.

Cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) infecting oak tasar silkworm, Anthraea proylei has been studied in relationship between larval mortality rates, time factor and dose response of ApCPV. LD₅₀ concentration of ApCPV is found to be 3.3×10^4 POBs/ml and LT₅₀ of ApCPV is 8.99 days in spring crop and 6.02 days in summer crop respectively against 3rd instar larvae of A. proylei. Prophylactic control measures against ApCPV infection in A. proylei larvae is possible by alkali treatment such as spraying 0.05% Sodium hypochlorite, 0.125 & 0.25% sodium hydroxide, 0.5% calcium hydroxide and mixture of 0.125% sodium hydroxide and 0.05% sodium hypochlorite solution once in every instar (I-IV) and twice in V instar, which gives better cocoon yield to the tune of 68% against the control of 30% cocoon harvest.

Keywords: *Anthraea proylei*, Cytoplasmic polyhedrosis virus, LC₅₀, LT₅₀, larval mortality, prophylactic control measures, cocoon harvest.

INTRODUCTION

The oak tasar silkworm, *Anthraea proylei* Jolly is an economically important insect, producing oak tasar silk. It is an hybrid between the Indian species of *A. roylei* Moore (Male) and *A. pernyi* Guerin (Female) of China (Jolly *et al.*, 1969). It is reared under semi domesticated condition in the Eastern Sub-Himalayan region of Northeast India, especially in Manipur and Nagaland and in indoor condition in Central and Western Himalayan states like Uttaranchal, Jammu and Kashmir respectively (Anonymous 1995). The production of non mulberry silk in India is reported to be 1860.00 t during 2005-06 and it has been steadily increasing over the last few years and fetches significant foreign exchange to our country (Anonymous 2005). However, the main constraint faced in silkworm rearing is its microbial diseases, resulting in considerable reduction in silk yield. Among the pathogens, viral disease takes a heavy toll of about 17% during spring crop and 37% in summer crop especially under the climatic conditions of Manipur (Reeta *et al.*, 2002). The viral infection of *A. proylei* is primarily due to Cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) of the genus Cypovirus and family Reoviridae (Varatharajan *et al.*, 1998). As such, not much work has been done on ApCPV with the exception of diagnosis and prevalence of the disease. Therefore, an attempt has been made to study the relationship between the larval mortality rates, time factor and dose response of ApCPV in terms of LC₅₀ and LT₅₀ of the 3rd instar larvae of *A. proylei*. Possible prophylactic control measures against ApCPV infection are also evaluated and discussed.

* Correspondence: rvrajanramya@rediffmail.com

MATERIALS AND METHODS

Cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) infected *A. proylei* larvae exhibiting typical symptoms of polyhedrosis were collected and stored in stoppered flask for putrefaction. The cadavers were filtered through cheese cloth after two weeks of putrefaction and subjected to centrifugation at 600rpm for a few minutes in a swing out rotor. The supernatant was collected and centrifuged at 10,000 rpm for five minutes to pellet polyhedral occlusion bodies (POBs). The pelleted POBs were further purified by following the standard protocols (Sudhakar *et al.*, 1997). The purified (POBs) of ApCPV were suspended in double distilled water and stored at 4°C. Four different concentrations of POBs were prepared from the original stock (5×10^9 POBs/ml) by diluting it appropriately with distilled water (Table I). The number of POBs present in each concentration was checked by haemocytometer (Narayanan, 1985; Battu and Ramkrishnan, 1987). In each treatment 75 larvae were inoculated in groups of 25 per replication. Before inoculating, the larvae were starved for 3 hours and later reared individually on virus treated oak leaf disc of 4 cm diameter (Rabindra *et al.*, 1997). As per the concentration stated in Table I, each leaf disc under each treatment was coated with 5µl of respective concentration of ApCPV and on air drying each leaf disc was fed to the larva in a petri plate 8.5 cm diameter (Varatharajan *et al.*, 2006). Equal number of control larvae were fed with water dipped leaf disc. On feeding the leaf disc, the larvae belonging to each replication were reared on fresh oak leaf in a separate wooden cage (30 × 30 × 30 cm). The mortality rate of the larvae due to CPV infection was noted for each concentration and these values were processed for probit analysis (Finney, 1977).

Table I. Mortality rate of *A. proylei* (3rd instar) at different concentrations of ApCPV treatment.

Tableau I. Taux de mortalité d'*A. proylei* (3^{ème} âge) avec différentes concentrations du traitement ApCPV.

Sl. No	Concentration of ApCPV OBs /ml ($\times 10^4$)	Mean larval mortality * (%)
No. de série.	Concentration d' OBs d'ApCPV / ml ($\times 10^4$)	Mortalité larvaire moyenne * (%)
T ₁	2.5	40.67 (39.64)b
T ₂	3.0	48.67 (44.25)b
T ₃	5.0	67.33 (55.12)c
T ₄	8.0	80.67 (63.94)d
T ₅	Control / Témoin	00.00 (00.00)a
C.D. at P < 0.05		5.63

* Figures followed by the same letter in the last column are not significantly different at P < 0.05 (ANOVA); F value = 466.22 / Les chiffres suivis par la même lettre dans la dernière colonne ne sont pas significativement différents à P < 0,05 (ANOVA).

Figures in parenthesis are Arc sine $\sqrt{\text{percentage transformed values}}$ / Les chiffres entre parenthèses sont les Arc sine $\sqrt{\text{valeurs transformées en pourcentage}}$



Figure 1. Symptoms of ApCPV infected larvae of *Antheraea proylei*.
Fig 1. Symptômes d'ApCPV chez des larves d'*Antheraea proylei* infestées.

In order to calculate Lethal time₅₀ (LT₅₀) of ApCPV, the polyhedra of ApCPV were applied on each leaf disc (4cm diameter) @ 5µl at the concentration of 3.3×10^4 POBs/ml (=LC₅₀ of 3rd instar). On feeding the leaf disc, the larvae were reared on fresh oak leaf as stated above. Larval mortality was recorded daily and the data analysed by using ANOVA as well as probit analysis.

To protect *A. proylei* larvae from CPV infection, prophylactic measures were attempted using certain chemicals namely, sodium hypochlorite, sodium hydroxide and calcium hydroxide of different concentration (Table V). Each treatment was tested separately by applying the chemicals individually on the eggs of *A. proylei* using a hand operated mini sprayer as per treatment schedule. Later, the eggs were washed in running water after five minutes of chemical application. Subsequently, the eggs were incubated at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and $80 \pm 5\%$ relative humidity till eggs hatched into larvae. In this experiment, totally there were 7 treatments (T₁ – T₇) and each one was replicated 3 times with 600eggs/treatment and hatching percent was recorded for each treatment. The above chemicals were further applied to the hatched out larvae (Table V). The larvae were reared under indoor conditions ($18 \pm 1.5^\circ\text{C}$ to $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$ and $65 \pm 5\% \text{RH}$). Each chemical was sprayed after 24h of moulting once

in 2nd to 4th instar and twice in 5th instar larvae during rearing. The larval mortality and survival percent and cocoon harvest were recorded and analysed using ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (CPV) infected larvae manifested the symptoms such as sluggishness, starvation, soft and loose cuticle with pale yellow body colour. The larvae usually died after 7-10 days of virus acquisition and hang head upside down by clasping with its caudal feet on the twig and ooze out brown colour liquid from the mouth (Figure 1).

Different concentration of polyhedral occlusion bodies (POBs) were fed to the larvae; it shows significant variation ($P < 0.05$) between treatments except for T₁ and T₂ in which the mean percentage mortality of larvae was 40.67 and 48.67%, whereas mortality under T₃ and T₄ treatment was 67.33 and 80.67% respectively (Table I). As the concentration increased, larval mortality also increased proportionately thereby showing a dose dependent relation. No mortality was observed among the untreated larvae and therefore, it was significantly different from other treatments T₁ – T₄ (Table I). The Probit analysis of the data based on dosage versus larval mortality indicated the LC₅₀ ApCPV against *A. proylei* larvae is 3.3×10^4 POBs/ml with lower and upper fiducial limit of 2.8×10^4 and 3.8×10^4 POBs/ml respectively (slope $b = 2.73989$; Probit regression line $Y = -5.273734 + 2.272536x$). The LC₉₀ was 12×10^4 POBs/ml (Table II). While the LC₅₀ of *Spilarctia oblique* nucleopolyhedrosis virus (SoNPV) against *S. oblique* and *Porthesia xanthorrhoea* kollar was 2.5×10^4 and 3.7×10^4 POBs/ml respectively (Varatharajan *et al.*, 2006).

Table II. Probit analysis on Dosage Versus Mortality rate of *A. proylei* (III instar) against ApCPV treatment.

Tableau II. Analyse Probit concernant le dosage d'ApCPV et le taux de mortalité d'*A. proylei* (3^{ème} âge).

Entry		95% confidence limits	
		Limites de l'intervalle de confiance à 95 %	
Donnée	POBs/ml	Upper Supérieure	Lower Inférieure
LC ₁₀	9052.67	14823.66	5528.38
LC ₅₀	33176.03	38463.88	28615.10
LC ₉₀	121582.90	174020.60	84911.96
Slope b / Pente b	2.73989		
Probit regression line Y =			
Ligne de régression probit Y = $-5.273734 + 2.272536 x$			

Table III. Mortality rate of *A. proylei* (III instar) at different duration due to ApCPV treatment.

Tableau III. Taux de mortalité d'A. proylei (3ème âge) avec différentes durées du traitement ApCPV.

Days after virus treatment <i>Nbre de jours après le traitement avec le virus</i>	Mean larval mortality (%)	
	Spring crop	Summer crop
	<i>Mortalité larvaire moyenne (%)</i>	
	<i>Récolte de printemps</i>	<i>Récolte d'été</i>
5*	-	16.33 (23.76)a
6	-	44.00 (41.51)b
7*	8.00 (5.13)a	84.67 (67.79)c
8	13.33 (21.13)b	96.33 (79.51)d
9	46.67 (43.11)c	100.00 (90.00)e
10	78.67 (62.51)d	-
11	97.67 (81.28)e	-
12	100.00 (90.00)e	-
CD at P < 0.05 =	15.85	9.22

To find out the relationship between the virus induced larval mortality and time factor, the larvae were fed with 3.3×10^4 POBs/ml (LC₅₀) during spring and summer crops. It is observed that in spring crop (March-May) the larval mortality began from 7th day after the post infection (p.i.) and it gradually increased over the period of next 5 days. The mortality rate was found to be 8, 13.3, 46.7, 78.6, 97.7 and 100% respectively on 7th to 12th day p.i. The data on percentage mortality from 7th to 11th day were found to be significantly different ($P < 0.05$) from each day, as it gradually went up from initial 8% to 98% at the last. However, cent percent mortality was noted eventually on the 12th day after p.i. In the case of summer crop, the larval mortality was noticed initially on the 5th day and cent percent larval death was noted on 9th day after p.i. The mean larval death increased from 16% on 5th day to 100% on the 9th day thereby reflecting significant difference ($P < 0.05$) between each day in terms of percentage larval death (Table III).

The Probit analysis of the data indicated that the LT_{50} was 8.99 and 6.02 days during spring and summer crops (Table IV). Similarly, the LT_{50} of SoNPV against *S. oblique* and *Porthesia xanthorrhoea* Kollar was 5.73 and 6.98 days respectively (Varatharajan *et al.*, 2006). In other words, the lethal time to kill 50% of the test population was found to be less during summer than in spring months. This difference in LT_{50} between summer and spring could be due to variation in climatic condition. For instance, the minimum temperature during spring and summer was 13 - 15°C and 17 - 22°C and RH being 60 - 85 % respectively. As the temperature and humidity were found to be much higher during summer than the spring, the polyhedra could have multiplied much faster in summer, as a consequence, the duration (LT_{50}) to kill the virus infected larvae would have been reduced in summer seasons. Other workers have also obtained similar observations. For instance, in the case of *B. mori*, Matsufora *et al.*, (1984) reported that silkworm become markedly susceptible to viral disease both at low and high temperatures. However, high temperature and low humidity during summer seasons were found to enhance viral infection among the larvae of *B. mori* (Sivaprakasam and Rabindra, 1995). The above views are in corroboration with the present study on *A. proylei* where in summer crop has showed more viral infection than that of spring crop.

Table IV. Time versus Mortality rate of *A. proylei* (III instar) larvae due to ApCPV treatment.

Tableau IV. Facteur temps par rapport au taux de mortalité des larves d'*A. proylei* (3^{ème} âge), sous l'effet du traitement ApCPV.

Time factor	Value (days)	
	Spring crop	Summer crop
	Valeur (jours)	
Facteur temps	Récolte de printemps	Récolte d'été
LT_{10}	7.69	4.83
LT_{50}	8.99	6.02
Upper limit / Limite supérieure	9.24	6.18
Lower limit / Limite inférieure	8.75	5.87
LT_{90}	10.51	7.50
Slope b / Pente b	18.835485	13.4124
Probit regression line Y		
Ligne Y de régression probit	- 12.96386+18.835485x	- 5.4553+13.41248x

Inoculation dose / Dose d'inoculation = 3.3×10^4 POBs/ml (= LC_{50}).

Table V. Effect of different chemicals on egg hatching and cocoon harvest of *Antheraea proylei*.**Tableau V. Effet de différents produits chimiques sur l'éclosion des oeufs et la récolte de cocons d'*Antheraea proylei*.**

Sl.No.	Treatment	Mean percentage	
		Egg hatching	Cocoon harvest
No. de série	Traitement	Pourcentage moyen	
		Eclosion des oeufs	Récolte de cocons
T ₁	Sodium hypochlorite (0.05%) <i>Hypochlorure de sodium (0,05 %)</i>	60.33 (50.99)b	66.00 (54.40)c
T ₂	Sodium hydroxide (0.125%) <i>Hydroxyde de sodium (0,125 %)</i>	62.33 (52.15)bc	61.00 (51.45)c
T ₃	Sodium hydroxide (0.25%) <i>Hydroxyde de sodium (0,25 %)</i>	54.09 (54.82)a	68.00 (55.69)c
T ₄	Sodium hydroxide (0.125%) and Sodium hypochlorite (0.05%) <i>Hydroxyde de sodium (0,125 %) et hypochlorure de sodium (0,05 %)</i>	68.82 (56.09)c	54.00 (47.31)c
T ₅	Calcium hydroxide (0.5%) <i>Hydroxyde de calcium (0,5 %)</i>	61.55 (51.70)bc	58.00 (49.61)c
T ₆	ApCPV-polyhedra @3.3 × 10 ⁴ OBs/ml <i>Polyèdres d'ApCPV à raison de 3,3 × 10⁴ OBS / ml</i>	62.99 (52.56)bc	0.00 (0.00)a
T ₇	Control (distilled water) <i>Témoin (eau distillée)</i>	55.12 (47.95)ab	30.00 (33.21)b
C.D. at P < 0.01		5.00	13.36

1. Figures followed by the same alphabet in each column are not significantly different { P < 0.01 [ANOVA]. F value = 8.58 and 42.62 respectively}. / Les chiffres suivis par la même lettre dans chaque colonne ne sont pas significativement différents { P < 0,01 [ANOVA]. Valeur F = respectivement 8,58 et 42,62}.

2. Figures given in parenthesis are Arc sine $\sqrt{\text{percentage transformed values}}$ / Les chiffres entre parenthèses sont les valeurs Arc sine $\sqrt{\text{transformées en pourcentage}}$.

In order to protect *A. proylei* from CPV infection, certain prophylactic measures were attempted using certain chemicals. Each treatment was tested separately by applying the chemicals individually on the eggs of *A. proylei* using a hand operated mini sprayer as per treatment schedule (Table V). Later, the eggs were washed in running water after five minutes of chemical application. Subsequently, the eggs were incubated at 22±2°C and 80±2% relative humidity till the egg hatch into larvae. In this experiment, totally there were 7 treatments (T₁ – T₇) and each one replicated 3 times with 600eggs/treatment. The percentage hatching was recorded for different treatments and it

ranged from 54.1 to 68.8%. Among the chemicals, T₄ treatment with the combination of NaOH + NaClO showed maximum level of egg hatching and the rest being below 62% (Table V). Although not much effect has been observed in terms of egg hatching percentage, surface sterilization of eggs certainly prevents the chances of transovarian transmission of cypovirus (Smith, 1976). Viral disease is one of the notable diseases because of the practical difficulty to combat the infection (Baig *et al.*, 1990). Antiviral compounds have not been discovered so far and the only way of protecting *A. proylei* from ApCPV infection would be through prophylactic methods. The efficacy of sodium hypochlorite at 5% and 2% on CPV is already known through the works of Miyajima, (1986); Hosny *et al.*, (1986). Bansal *et al.*, (1996) also reported that the effectiveness of sodium hypochlorite against virosis of *A. mylitta* even at a low concentration of 0.01%. However combination of sodium hydroxide (0.125%) and sodium hypochlorite (0.05%) yield better result. Patil (1991) reported that 0.5% calcium hydroxide has significantly reduced the incidence of mulberry silkworm. It is not only against CPV, but equally effective against the infection of BmNPV (Sivaprakasam and Rabindra, 1996). Calcium hydroxide is also used in Japan for rearing *Bombyx mori* especially during the time of CPV infection (Govindan *et al.*, 1998). Each chemical was sprayed 5 times [@ one round/instar] on the larvae reared under respective treatments (Table V). The result showed that all the chemical treatments (T₁ – T₅) were found to be significantly ($P < 0.01$) better than that of control and among the chemicals tested there was not any difference in terms of cocoon harvest which ranged from 54 to 68% with the mean of 61%. On the contrary, the control (T₇) gave only 30% cocoon harvest; while ApCPV treated larvae (T₆) showed 100% mortality. Although cypovirus seems to be comparatively less susceptible to weak alkali than NPV in general (Smith, 1976), by spraying alkali once in every instar, the silkworm can be protected from ApCPV and increase the cocoon yield. Chemicals like sodium hypochlorite (0.01%) and calcium hydroxide (0.5%) are already known prophylactic agents against viruses infecting the Tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Bansal *et al.*, 1996) and cypovirus attacking the mulberry worm, *Bombyx mori* L. (Patil, 1991). Therefore, keeping the above treatments in mind, it is possible to protect *Antheraea proylei* from viral infection by alkali treatment.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the Central Silk Board, Bangalore and also to Manipur University for providing required facilities.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1995) Status paper on oak tasar culture in North East Region. Regional Tasar Research Station, Central Silk Board, Manipur, pp.10.
- ANONYMOUS (2005) Annual Report. Central Silk Board, Bangalore.
- BAIG M., NATARAJU B. & SAMSON M. V. (1990) Studies on effect of antibiotics on rearing performance and losses due to diseases in silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 29 (1):54-58.
- BANSAL A.K., SHUKLA R.M., ROY D.K., SAXENA N.N., GOEL A.K., SINHA B.R.R.P. & SINHA S.S. (1996) Efficacy of Asiphor and Sodium hypochlorite in controlling diseases of the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury. Bull. Sericult. Res., 7: 45-48.
- BATTU G. S. & RAMAKRISHNAN N. (1987) Investigations on the nuclear polyhedrosis viruses of *Diacrisia obliqua* (Walker): Bioassay of viral activity. Entomon, 12: 81-84.
- FINNEY J.D. (1977) Probit Analysis, Cambridge University Press, London. pp. 333.
- GOVINDAN R., NARAYASWAMY T. K. & DEVAIAH M. C. (1998) Principles of Silkworm Pathology. Pp. 1 – 420. Seri. Scientific Publishers, Bangalore.
- HOSNY A., EL-KARAKSY I. A. & KOTBI F. A. (1986) Effect of some disinfectants on larval mortality rates and silk yield of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric. XXV, 1: 29-32.

- JOLLY M.S., NARASIMHAN M. N., SINHA S.S. & SEN S. K. (1969) Interspecific hybridization in *Antheraea*. Indian J. Heredit., 1: 45 – 48.
- MIYAJIMA S. (1986) Res. Bull. Aichi-Ken Agril. Res. Centre, Japan. 18: 280 – 282.
- MATSUBORA F., Wu Y. L., MORI H. & OOGESHIRA H. (1984) Changes in the resistance to the infection with nuclear polyhedrosis virus induced by low and high temperature treatment in the germ free silkworm, *Bombyx mori* L. Journal of sericulture science, Japan. 53 (6): 538-542.
- NARAYANAN K. (1985) Isolation, purification and inoculation of viral pathogens. In Microbial control and Pest Management, (ed Jayaraj, S.), Tamil Nadu Agricultural University, Arul Jothi Printers, Coimbatore, pp. 76-86.
- PATIL C. S. (1991) Studies on the evaluation of Calcium hydroxide against Cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm, *Bombyx mori* L. Entomon, 16 (2): 147-150.
- RABINDRA R. J., RAJASEKARAN B. & JAYARAJ S. (1997) Combined action of nuclear polyhedrosis virus and neem bitter against *Spodoptera littura* (Fab.) larvae. J. Biol. Control, 11: 5-9.
- REETA L., BIREN RANA., SINGH N.I. & VARATHARAJAN, R. (2002) Incidence pattern of viral disease affecting the oak tasar silkworm, *Antheraea proylei* J. (Saturniidae : Lepidoptera). In Recent Advances in Life Sciences, (ed. Yadava, P.S.), Manipur University, Imphal, pp. 106-108.
- SIVAPRAKASAM N. & RABINDRA R.J. (1995) Incidence of Grasserie in silkworm *Bombyx mori* L. in selected districts of Tamil Nadu. Indian Journal of Sericulture. 34(2): 100-104.
- SIVAPRAKASAM N. & RABINDRA R. J. (1996) Efficacy of calcium hydroxide against nuclear polyhedrosis virus of silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 35(2): 150-151.
- SMITH K. M. (1976) Virus – Insect Relationships, Longman, London. pp. 291.
- SUDHAKAR S., VARATHARAJAN R. & MATHAVAN S. (1997) A simple method to purify polyhedral bodies from *Nosema* (Microsporoidea) contamination. Entomon, 22: 89-93.
- VARATHARAJAN R., SINGH M.I. & REETA L. (2006) Cross infectivity of *Spilarctia obliqua* nuclear polyhedrosis virus against the mulberry pest, *Porthesia xanthorrhoea* Kollar. Indian J. exptl. biol. 44 (5): 1-3.
- VARATHARAJAN R., SUDHAKAR S., REETA L., IBOHAL SINGH N. & MATHAVAN S. (1998) Occurrence of reovirus in oak tasar silkworm, *Antheraea proylei*. Current Science, 75 (7): 724 – 726.

VIRUS DE LA POLYEDROSE CYTOPLASMIQUE INFESTANT LE VER A SOIE TASAR DU CHENE, *ANTHERAEA PROYLEI* JOLLY (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE)

L. REETA, T. JAMES KEISA, K. CHAOBA SINGH & R. VARATHARAJAN^{1*}

Regional Tassar Research Station, Mantripukri, Imphal - 795 002, Manipur, Inde.

1. Department of Life Sciences, Manipur University, Imphal – 795 003, Manipur, Inde.

*On a étudié le virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV) qui infeste le ver à soie tassar du chêne *Antheraea proylei* par rapport aux taux de mortalité larvaire, au facteur temps et à la réponse à la dose d'ApCPV. La concentration LD₅₀ d'ApCPV s'avère être de $3,3 \times 10^4$ POBs / ml et la LT₅₀ d'ApCPV est de respectivement 9 jours pour la récolte de printemps et de 6,02 jours pour la récolte d'été chez les larves d'*A. proylei* du 3^{ème} âge. Des mesures de lutte prophylactique contre l'infestation par ApCPV sont possibles grâce aux traitements alcali tels que la vaporisation d'hypochlorure de sodium à 0,05 %, d'hydroxyde de sodium à 0,125 et 0,25 %, d'hydroxyde de calcium à 0,5 % et de mélange d'hydroxyde de sodium à 0,125 % et de solution d'hypochlorure de sodium à 0,05 % une fois à chaque âge (du 1er au 4ème âge) et deux fois pendant le 5ème âge, ce qui donne un meilleur rendement en cocons de l'ordre de 68 % par rapport au témoin dont la récolte de cocons est de 30 %.*

INTRODUCTION

Le ver à soie tassar du chêne, *Antheraea proylei* Jolly est un insecte important sur le plan économique, qui produit la soie tassar du chêne. C'est un hybride entre l'espèce indienne *A. roylei* Moore (mâle) et *A. pernyi* Guerin (Femelle) de Chine (Jolly et coll., 1969). Il est élevé dans des conditions semi-domestiques dans l'est de la zone sub-himalayenne dans le nord-est de l'Inde, surtout à Manipur et à Nagaland et à l'intérieur dans les états de l'Himalaya du centre et de l'ouest tels que respectivement l'Uttaranchal, le Jammu et Cachemire (Anonyme, 1995). La production de soie non-mûr en Inde s'est élevée à 1860 t en 2005-06 et elle a régulièrement augmenté au cours des dernières années et a rapporté des devises étrangères importantes. (Anonyme, 2005). Cependant, la principale contrainte de cet élevage sont les maladies microbiennes, qui entraînent une diminution considérable du rendement en soie. Parmi les pathogènes, les maladies virales représentent des pertes importantes d'environ 17 % pendant la récolte de printemps et de 37 % pendant la récolte d'été surtout dans les conditions climatiques du Manipur (Reeta et coll., 2002). L'infestation virale de *A. proylei* est principalement due au virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV) du genre Cypovirus de la famille des Reoviridae (Varatharajan et coll., 1998). Il n'y a pas eu beaucoup de travaux réalisés sur ApCPV à l'exception du diagnostic et de la fréquence de la maladie. Nous avons donc essayé d'étudier la relation entre les taux de mortalité larvaire, le facteur temps et la réponse à la dose d'ApCPV en termes de LC₅₀ et LT₅₀ chez les larves du 3^{ème} âge de *A. proylei*. Nous évaluons et présentons ici les mesures de lutte prophylactiques possibles contre l'infestation par ApCPV.

* Auteur auquel adresser la correspondance : rvrajanramya@rediffmail.com

MATERIELS ET METHODES

On recueille les larves d'*A. proylei*, qui présentent les symptômes typiques de l'infestation par le virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV) et on les stocke dans une fiole fermée pour qu'elles se putréfient. On filtre les cadavres au travers d'une mousseline après deux semaines de putréfaction et on les soumet à une centrifugation à 600 tpm pendant quelques minutes dans un rotor oscillant. On recueille le surnageant et on le centrifuge à 10 000 tpm pendant cinq minutes pour culotter les corps d'occlusion polyédraux (POB). On purifie à nouveau les POB culottés en suivant les protocoles standard (Sudhakar et coll., 1997). On suspend les POB purifiés d'ApCPV dans de l'eau distillée deux fois et on les stocke à 4 ° C. On prépare quatre concentrations différentes de POB à partir de la culture mère (5×10^9 POB / ml) en les diluant de manière appropriée avec de l'eau distillée (Tableau I). On vérifie le nombre de POB présent pour chaque concentration avec un hémocytomètre (Narayanan, 1985 ; Battu et Ramkrishan 1987). Pour chaque traitement, on inocule 75 larves en groupes de 25 par répétition. Avant l'inoculation, on affame les larves pendant 3 heures et plus tard, on les élève individuellement sur un disque de feuille de chêne de 4 cm de diamètre traité au virus (Rabindra et coll., 1997). Comme il est précisé dans le Tableau I pour la concentration, chaque disque de feuille traitée est recouvert avec 5 µl de la concentration respective d'ApCPV et après qu'il ait séché à l'air, on nourrit les larves avec les disques de feuilles dans des assiettes de petri de 8,5 cm de diamètre (Varatharajan et coll., 2006). Un nombre égal de larves témoins est nourri avec des disques de feuilles trempés dans l'eau. Après qu'elles se soient nourries sur les disques de feuilles, on élève les larves appartenant à chaque répétition sur de la feuille de chêne fraîche dans une cage en bois séparée (30 × 30 × 30 cm). On note le taux de mortalité des larves provoqué par l'infestation, pour chaque concentration et on soumet ces données à l'analyse probit (Finney, 1977).

Pour calculer la durée mortelle 50 (LT₅₀) d'ApCPV, on applique les polyèdres d'ApCPV sur chaque disque de feuilles (4 cm de diamètre) à raison de 5 µl à la concentration de $3,3 \times 10^4$ POB / ml (= LC₅₀ du 3^{ème} âge). Après qu'elles se soient nourries sur les disques de feuille, on élève les larves sur de la feuille de chêne fraîche d'après la description ci-dessus. On enregistre la mortalité larvaire quotidiennement et on analyse les données en utilisant l'ANOVA ainsi que l'analyse probit.

Pour protéger les larves d'*A. proylei* de l'infestation par CPV, on essaie des mesures prophylactiques, en utilisant certains produits chimiques, à savoir l'hypochlorure de sodium et l'hydroxyde de calcium à différentes concentrations (Tableau V). On teste chaque traitement séparément en appliquant les produits chimiques individuellement sur les œufs d'*A. proylei* en utilisant un mini vaporisateur manuel en fonction du calendrier de traitement. Ensuite, on lave les œufs à l'eau courante, cinq minutes après l'application du produit chimique. Par la suite, on incube les œufs à 24 ± 2° C et 80 ± 5 % d'humidité relative jusqu'à ce que les larves éclosent. Dans cette expérience, en tout, il y a 7 traitements (T1 à T7) et chacun d'eux est répété 3 fois, avec 600 œufs / traitement, et on enregistre le pourcentage d'éclosion pour chaque traitement. On applique à nouveau les produits chimiques ci-dessus aux larves qui ont éclos (Tableau V). On élève les larves à l'intérieur (conditions de 18 ± 1,5° C à 25 ± 2,5° C et 65 ± 5 % d'HR). On vaporise le produit chimique une fois, 24 h après la mue du 2^{ème} au 4^{ème} âge et deux fois chez les larves du 5^{ème} âge pendant l'élevage. On analyse la mortalité larvaire, le pourcentage de survie et le nombre de cocons récoltés en utilisant l'ANOVA.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les larves infestées par le Virus de la Polyédrose Cytoplasmique (CPV) manifestent des symptômes tels que la léthargie, l'absence d'alimentation, leur cuticule est tendre et lâche et leur corps de couleur jaune pâle. Les larves meurent habituellement au bout de 7 à 10 jours après l'acquisition du virus, pendent la tête vers le bas en s'agrippant aux brindilles avec leurs pattes caudales et un liquide brunâtre suinte de leur bouche (Figure 1).

On nourrit les larves avec les différentes concentrations de corps d'occlusion polyédriques (POB) ; on observe une variation significative ($P < 0,05$) entre les traitements sauf pour T1 et T2, pour lesquels le pourcentage de mortalité moyenne des larves est de 40,67 et 48,67 %, tandis que la mortalité pour les traitements T3 et T4 est de respectivement 67,33 et 80,67 % (Tableau I). Alors que la concentration augmente, la mortalité augmente aussi de manière proportionnelle, ce qui montre donc qu'il existe une relation qui dépend de la dose. On n'observe pas de mortalité chez les larves non traitées et il y a donc une différence significative avec les autres traitements T1 à T4 (Tableau I). L'analyse Probit des données concernant le rapport entre la dose et la mortalité larvaire montre que le LC_{50} d'ApCPV par rapport aux larves *A. proylei* est de $3,3 \times 10^4$ POB / ml avec une limite repère inférieure et supérieure de respectivement $2,8 \times 10^4$ et de $3,8 \times 10^4$ POB / ml (pente $b = 2,73989$, ligne de régression probit $Y = -5,273734 + 2,272536x$). La LC_{90} est de 12×10^4 POB / ml (Tableau II). Tandis que le LC_{50} du virus de la polyédrose nucléaire de *Spilarctia oblique* (SoNPV) par rapport à *S. oblique* et à *Porthesia xanthorrhoea* kollar est de respectivement $2,5 \times 10^4$ et de $3,7 \times 10^4$ POB / ml (Varatharajan et coll., 2006).

Pour trouver la relation entre la mortalité induite par le virus et le facteur temps, on nourrit les larves avec $3,3 \times 10^4$ POB / ml (LC_{50}) pendant les récoltes du printemps et de l'été. On observe que pendant la récolte de printemps (mars – mai) la mortalité larvaire commence à partir du 7^{ème} jour après l'infestation (p. i.) et elle augmente progressivement pendant les 5 jours suivants. Le taux de mortalité s'avère être de respectivement 8 ; 13,3 ; 46,7 ; 78,6 ; 97,7 et de 100 % du 7^{ème} au 12^{ème} jour après l'infestation. Les données sur le pourcentage de mortalité du 7^{ème} au 11^{ème} jour s'avèrent être significativement différentes ($P < 0,05$), puisqu'il augmente progressivement de 8 % au début à 98 % à la fin. Cependant, on observe finalement un pourcentage de 100 % de mortalité le 12^{ème} jour après l'infestation. Dans le cas de la récolte d'été, on note un commencement de mortalité larvaire le 5^{ème} jour et on enregistre un pourcentage de 100 % de mortalité larvaire le 9^{ème} jour après l'infestation. La mortalité larvaire moyenne passe de 16 % le 5^{ème} jour à 100 % le 9^{ème} jour, ce qui reflète donc une différence significative ($P < 0,05$) entre chaque jour, en termes de pourcentage de mortalité larvaire (Tableau III).

L'analyse Probit des données indique que le LT_{50} est de 8,99 et de 6,02 jours pendant les récoltes du printemps et de l'été (Tableau IV). De même, le LT_{50} de SoNPV par rapport à *S. oblique* et *Porthesia xanthorrhoea* Kollar est de respectivement 5,73 et 6,98 jours (Varatharajan et coll., 2006). En d'autres termes, la durée létale pour tuer 50 % de la population testée s'avère être inférieure pendant l'été que pendant le printemps. Par exemple, la température minimum pendant le printemps et l'été est de respectivement 13 à 15° C et de 17 à 22° C et l'HR est de 60 à 85 %. Comme la température et l'humidité s'avèrent être beaucoup plus élevées en été qu'au printemps, les polyèdres pourraient s'être multipliés beaucoup plus rapidement en été, par conséquent la durée (LT_{50}) pour tuer les larves infestées par le virus diminuerait pendant l'été. D'autres chercheurs ont aussi obtenu des résultats similaires. Par exemple, dans le cas de *B. mori*, Matsufora et coll., (1984) ont rapporté que le ver à soie devient manifestement sensible à la maladie virale à la fois à des températures basse et élevée. Cependant, la température élevée et l'humidité faible pendant l'été s'avèrent accentuer l'infestation virale chez les larves de *B. mori* (Sivaprakasam et Rabindra, 1995). Les points de vue ci-dessus sont en accord avec l'étude actuelle sur *A. proylei* selon laquelle la récolte d'été présente plus d'infestation virale que la récolte de printemps.

Pour protéger *A. proylei* de l'infestation par CPV, on a essayé des mesures prophylactiques en utilisant certains produits chimiques. On teste chaque traitement séparément en appliquant les produits chimiques individuellement sur les œufs d'*A. proylei*, en utilisant un mini vaporisateur manuel d'après le calendrier de traitement (Tableau V). Ensuite, on lave les œufs à l'eau courante au bout de 5 minutes après l'application chimique. Par la suite, on incube les œufs à $22 \pm 2^\circ \text{C}$ et avec une humidité relative de $80 \pm 2\%$ jusqu'à ce que les larves éclosent. Dans cette expérience, en tout, il y a 7 traitements (T1 à T7) et chaque traitement est répété 3 fois, avec 600 œufs / traitement. On enregistre le pourcentage d'éclosion pour les différents traitements et il est compris entre 54,1 et 68,8 %. Parmi les produits

chimiques, le traitement T4 avec la combinaison de NaOH + NaClO présente le niveau maximum d'éclosion des œufs (62 %) (Tableau V). Bien qu'on n'observe pas beaucoup d'effet en termes de pourcentage d'éclosion des œufs, la stérilisation de la surface des œufs empêche certainement les risques de transmission transovarienne du cypovirus (Smith, 1976). Les maladies virales sont marquantes à cause des difficultés pratiques à combattre les infestations (Baig et coll., 1990). On n'a pas découvert de composants antiviraux jusqu'à présent et le seul moyen de protéger *A. proylei* de l'infestation par ApCPV serait les méthodes prophylactiques. On connaît déjà l'efficacité de l'hypochlorure de sodium à 5 % et à 2 % sur le CPV grâce aux travaux de Mijayima (1986) ; d'Hosny et coll., (1986). Bansal et coll., (1996) ont aussi signalé l'efficacité de l'hypochlorure de sodium contre la virose d'*A. mylitta*, même à une faible concentration de 0,01 %. Cependant, la combinaison d'hydroxyde de sodium (0,125 %) et d'hypochlorure de sodium (0,05 %) donne les meilleurs résultats. Patil (1991) a rapporté que l'hydroxyde de calcium à 0,5 % a significativement diminué l'incidence chez le ver à soie du mûrier. Il n'est pas seulement efficace contre CPV, mais aussi contre l'infestation par BmNPV (Sivaprakasam et Rabindra, 1996). On utilise aussi l'hydroxyde de calcium au Japon pour l'élevage de *Bombyx mori*, surtout pendant la période de l'infestation par CPV (Govindan et coll., 1998). On vaporise chaque produit chimique 5 fois (à raison d'une fois pendant chaque âge) sur les larves élevées, en suivant les traitements respectifs (Tableau V). Les résultats montrent que tous les traitements chimiques (T1 à T5) s'avèrent significativement meilleurs ($P < 0,01$) que le témoin et parmi les produits chimiques testés, il n'y a pas de différence en termes de récolte de cocons, qui sont comprises entre 54 à 68 %, avec une moyenne de 61 %. A l'opposé, le témoin (T7) donne seulement une récolte de cocons de 30 % ; tandis que les larves traitées avec l'ApCPV (T6) présentent 100 % de mortalité. Bien que le cypovirus semble être comparativement moins sensible à l'alcali faible que le NPV en général (Smith, 1976), la vaporisation d'alcali une fois pendant chaque âge, peut protéger le ver à soie de l'ApCPV et augmenter le rendement en cocons. Les produits chimiques comme l'hypochlorure de sodium (0,01 %) et l'hydroxyde de calcium sont des agents prophylactiques déjà connus contre les virus qui infestent le ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* Drury (Bansal et coll., 1996) et le cypovirus qui attaque le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. (Patil, 1991). Il est donc possible en appliquant les traitements ci-dessus, de protéger *Antheraea proylei* de l'infestation virale par le traitement alkali.

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND HUMIDITY MAINTAINED DURING COCOON SPINNING ON REELING PERFORMANCE AND QUALITY OF RAW SILK OF INDIAN BIVOLTINE HYBRID COCOONS

SUBHAS V. NAIK* & T. H. SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, BTM Layout, Madiwala,
Bangalore- 560068, India.

The reeling performance of cocoons and quality of raw silk reeled has been studied in relation to temperature and humidity maintained during cocoon spinning in the case of Bivoltine hybrid cocoons. Two temperatures viz. 27° C and 30° C and humidity conditions viz. 70% and 90% with air circulation and without air circulation were maintained using SERICATRON during cocoon spinning by matured silkworms. In order to study the interaction between cooking condition and cocoon quality on reeling performance, cocoons were cooked using Open pan cooking method and Pressurised cooking method. Cocoons were reeled using Central Silk Technological Research Institute Multiend reeling package. Results indicated that reeling characteristics viz. reelability, raw silk yield and quality of raw silk are significantly better in the case of cocoons spun under low temperature and low humidity conditions, as compared to those spun under high temperature and high humidity condition. High temperature and high humidity conditions particularly, without air circulation have affected severely reelability, raw silk yield, raw silk neatness and cleanness and tensile properties of raw silk. It is also observed that air circulation during cocoon spinning has improved reeling performance and quality characteristics of raw silk significantly both in case of high and low humidity. This may be attributed to the structural changes in the sericin under high humidity during cocoon spinning, resulting in increased stripping resistance of cocoon filament. The study clearly indicates that temperature, humidity maintained and air circulation during cocoon spinning have direct bearing on reelability and hence raw silk yield of cocoons and quality of raw silk.

Keywords: Temperature, humidity, Cocoon spinning, reelability, Neatness, Cleanness, Cohesion.

INTRODUCTION

Uniform and proper softening and swelling of sericin during cocoon cooking depends upon the sericin characteristics, cocoon drying and cooking conditions. Trouble free unwinding of the cocoon filament from the cocoon shell is possible only when sericin of all the filament layers in the cocoons is softened uniformly to the required level. The studies have been conducted in Japan to understand the influence of temperature and humidity during cocoon spinning stage on reelability (Akahane 1994, Shang Tian Wu 1976). But information available on the influence of temperature and humidity maintained during cocoon spinning on reeling performance viz. raw silk recovery, waste %, and yarn

* Author to whom correspondence may be addressed.

quality viz. cleanness, neatness, tensile properties and cohesion of raw silk is scanty, particularly with Indian bivoltine hybrid cocoons and hence the present study has been carried out.

MATERIALS AND METHODS

Raw material:

Bivoltine hybrid cocoons (CSR2 × CSR5) were reared under identical conditions. Healthy matured silk worms were divided into four batches and kept for cocoon spinning separately in different SERICATRONS. During cocoon spinning (72 hours) following temperature and humidity conditions were maintained:

Batch-I :	30° C temp & 90% RH (without air circulation)
Batch - II :	30° C temp & 90% RH (with air circulation of about 50cms/sec)
Batch – III :	27° C temp & 70% RH (without air circulation)
Batch – IV :	27° C temp & 70% RH(with air circulation of about 50cms/sec)

Cocoons were harvested separately batch wise after 6 days. Cocoons were assessed for their characteristics.

Cocoon drying:

The cocoons were dried in a batch type hot air drier to the optimum level using temperature profile of 115°C to 55°C for 5 hrs.

Cocoon cooking:

Cocoons in each batch were further divided into two parts and cooked employing open pan cooking method and pressurized cooking method.

Open pan cooking:

Cocoons were cooked at boiling temperature for 3 minutes and then cocoons were taken for reeling.

Pressurised cooking:

Cocoons were cooked using CSTRI pressurized cooking machine by employing following temperature and duration profile.

Retting temp & duration	70°C,	120 secs
High temperature for permeation & duration	90°C	120 secs
Low temperature water permeation & duration	75° C	60secs
Steam Cooking temperature & duration	97°C	120 secs
Adjustment temp & duration	96°C to 75°C	in 4min
Finishing temp & duration	45°C	45 secs
Cooked cocoons were brushed at	80° C	

Reeling:

Reeling of cocoons samples were carried out on CSTRI multiend reeling machine using 100 m / min reeling speed, 40°C reeling basin water temperature and 8cms croissure length.

Water Quality:

Water having 7.1 pH, 70 ppm hardness and 100 ppm Alkalinity was used for the study.

Reeling characteristics:

From the results, reeling characteristics viz. Reelability, Raw silk recovery, Raw silk % and waste % on silk weight were calculated.

Raw silk testing:

The raw silk samples were tested for cleanness, neatness, low neatness and cohesion characteristics using Seriplane tester and cohesion tester. Further tenacity and elongation of raw silk were tested at constant rate of extension on an Instron (Model 5500 R) tensile tester interfaced with computer following standard procedure.

RESULTS AND DISCUSSIONS**Influence of temperature & humidity on Reeling characteristics:**

Average results of influence of Temperature and Humidity on Reeling performance results are given in Table I and II. The results of analysis of variance are given in Table III. Results (Tables I, II) indicate that reelability, filament length, raw silk % are significantly better in case of cocoons spun by maintaining low temperature and low humidity as compared to those spun under high temperature and high humidity. High temperature and high humidity (particularly without air circulation) have affected the reelability, filament length, non-broken filament length and raw silk % very severely.

Influence of temperature and humidity on reelability, Avg. filament length, non broken filament length, single cocoon filament denier, raw silk % and waste % on silk weight is observed to be highly significant at 1 % level. From the CD values (Tables I and II) it is observed that difference in reeling characteristics between the treatments is significant at 1% level.

Results indicate that (Tables I to II) pressurised cooking method has given significantly better reeling performance as compared to open pan method. This could be attributed to the better softening and swelling of sericin of all layers of cocoon filament of cocoon shell in case of pressurised cooking (using CSTR cooking principle) as compared to undercooking of cocoons in case of open pan, where cocoons are cooked at only one temperature for less duration than required. Results indicate that cocoon cooking has a significant role in achieving better reeling performance. However, from the results (Tables I and II), it can be observed that even with pressurised cooking technique reeling performance results are not satisfactory in the case of cocoons spun under high temperature and high humidity conditions, particularly without air circulation as compared to the cocoons spun under low temperature and low humidity conditions.

Significant reduction in reelability, raw silk % and significant increase in waste % in the case of cocoons spun under high temperature and high humidity conditions could be attributed to the structural changes in the sericin. Akahane et al. (1994) have established a relation between water content of cocoon layer during the spinning stage and reelability of cocoons. Their study with bivoltine hybrid cocoons of Japanese origin indicate that the water content in the cocoon layers during cocoon spinning is significantly higher when the humidity is more as compared to that when the humidity is less; correspondingly, the reelability of the cocoons is poor at high humidity. They have recommended that water content of the cocoon layer should be below 20% during cocoon spinning to obtain good reelability. They have pointed out that more water content (because of delayed evaporation) in the cocoon shell layers during cocoon spinning reduces the reelability of cocoons. This leads to the point that the low rate of evaporation of water content from cocoon layers during cocoon spinning would influence the structure of sericin. It is to be noted that when the humidity (of ambient conditions) is high during cocoon spinning, water present in the spinning solution, silk worm urine and silk worm faeces is evaporated slowly influencing the structure of sericin. This can be expected to reduce the solubility of sericin and increase the agglutination force between the cocoon filament and cocoon shell. This in turn would result in reduced sericin swelling and softening during

cooking affecting the reelability. Therefore to achieve good reelability, it is essential to remove/evaporate the water from filament quickly during cocoon spinning.

Table I. Influence of temperature and humidity during cocoon spinning on reeling performance.

Tableau I. Influence de la température et de l'humidité pendant le filage du cocon sur la performance de dévidage.

Temperature and humidity	Reelability (%)		Avg. Filament length (m)		Non-broken filament length (m)	
	Open pan Cooking	Pressurised Cooking	Open pan Cooking	Pressurised Cooking	Open pan Cooking	Pressurised Cooking
<i>Température et humidité</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>		<i>Longueur moyenne du filament (m)</i>		<i>Longueur du filament sans rupture (m)</i>	
	<i>Cuisson ouverte à la bassine</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>	<i>Cuisson ouverte à la bassine</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>	<i>Cuisson ouverte à la bassine</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>
30° C 90 % RH (without air current / <i>sans courant d'air</i>)	21.80	26.85	806	823	176	221
30° C & 90 % RH (with air current / <i>avec courant d'air</i>)	24.00	37.70	882	934	212	352
27° C & 70 % RH (without air current / <i>sans courant d'air</i>)	78.70	85.30	1107	1118	872	953
27° C & 70% RH (with air current / <i>avec courant d'air</i>)	90.40	91.45	1115	1120	1008	1024
CD ($P \leq 0.05$) for Temp., RH & Air current treatment / <i>CD ($P \leq 0.05$) pour la Temp., HR & traitement par courant d'air</i>	2.12		11		23	
Cooking method <i>Méthode de cuisson</i>	1.50		8		16	
Treat. × Method <i>Trait × Méthode</i>	0.02		0.76		3.65	

Table II. Influence of temperature & humidity during cocoon spinning on reeling performance.*Tableau II. Influence de la température et de l'humidité pendant le filage du cocon sur la performance de dévidage.*

Temperature and humidity	Single cocoon filament denier		Raw silk %		Waste % on silk	
	Open pan Cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking
<i>Température et humidité</i>	<i>Titre du filament du cocon</i>		<i>% de Soie Grège</i>		<i>% de déchets par rapport à la soie</i>	
	<i>Cuisson ouverte à la bassine</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>	<i>Cuisson ouverte à la bassine</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>	<i>Cuisson ouverte à la bassine</i>	<i>Cuisson pressurisée</i>
30° C & 90 % RH (without air current / <i>sans courant d'air</i>)	2.42	2.45	12.81	13.25	62.05	58.25
30° C & 90 % RH (with air current / <i>avec courant d'air</i>)	2.42	2.43	13.97	16.43	58.95	41.10
27° C & 70 % RH (without air current / <i>sans courant d'air</i>)	2.53	2.55	18.30	18.55	11.70	10.45
27° C & 70 % RH (with air current / <i>avec courant d'air</i>)	2.59	2.60	18.85	18.92	11.10	9.45
CD ($P \leq 0.05$) for Temp., RH & air current treatment	0.01			0.53		2.58
CD ($P \leq 0.05$) pour Traitement Temp., HR & courant d'air						
Cooking method	0.01			0.38		1.82
<i>Méthode de cuisson</i>						
Treat. × Method	0.02			0.76		3.65
<i>Trait. × Méthode</i>						

Liang Jan Zhu (1995) has pointed out that, striping resistance of cocoon filament from the cocoons (during unwinding) is weak in case of cocoons spun under low temperature and low humidity conditions because of presence of only random coil structure in sericin and stripping resistance (and hence adhesive strength of sericin) is more in case of cocoons spun under high temperature and high humidity conditions because, sericin molecule in solution transforms from random coil to β structure due to the delayed drying of sericin.

Tableau III. Analyse de variance pour les résultats de la performance de dévidage.

Treatment condition	Mean sum of squares						
	Degree of freedom	Reelability	Filament length	Nonbroken filament length	Cocoon filament denier	Raw Silk percentage	Waste % on silk weight
	Somme moyenne des carrés						
Conditions de traitement	Degrés de liberté	Dévidabilité	Longueur du filament	Longueur du filament sans rupture	Titre du filament de cocon	Pourcentage de soie grège	% de déchets par rapport au poids de la soie
Tmp., RH & Air current <i>Tmp., RH & courant d'air</i>	3	4703.175**	91667.5**	710966.896**	0.02681**	144.757**	2698.731**
Cooking method <i>Méthode de cuisson</i>	1	174.24**	1764**	20093.063**	0.001406**	12.250**	150.676**
Tmp., RH & Air current and cooking method <i>Tmp., RH & courant d'air & méthode de cuisson</i>	3	27.872**	437.5**	2871.896**	0.00005625 ^{NS}	5.867**	62.224**
Replication <i>Répétition</i>	1	0.423 ^{NS}	6.25 ^{NS}	45.563 ^{NS}	0.00005625 ^{NS}	1.051	4.951 ^{NS}
Error / <i>Ecart</i>	7	1.610	42.679	186.277	0.000042	0.479	2.379

** Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %*. * Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %*. NS : Non significant / *Non significatif*.

Table IV. Influence of temperature and humidity during cocoon spinning on quality characteristics of raw silk.

Tableau IV. Influence de la température et de l'humidité pendant le filage du cocon sur les caractéristiques de qualité de la soie grège.

Temperature and humidity	Neatness %		Low neatness %		Cleanness %		Tenacity (G/D)		Elongation (%)		Cohesion (strokes)	
	OP*	PC**	OP	PC	OP	PC	OP	PC	OP	PC	OP	PC
Température et humidité	Netteté %		Netteté minimum %		Propreté %		Ténacité (G/D)		Allongement (%)		Cohésion (Passages)	
	OP*	PC**	OP	PC	OP	PC	OP	PC	OP	PC	OP	PC
30° C & 90 % RH (without air current / sans courant d'air)	64	83	58	75	64	82.5	3.6	3.8	16.4	17.9	66	74
30° C & 90 % RH (with air current / avec courant d'air)	71	87	65	78	69	88.5	3.6	4.1	17.5	19.1	83	146
27° C & 70 % RH (without air current) (sans courant d'air)	90	94	83	89	89	94	4.0	4.2	19.3	23.0	71	114
27° C & 70 % RH (with air current / avec courant d'air)	90	95	88	93	91	97	3.9	4.3	20.6	24.6	63	127
CD ($P \leq 0.05$) for Temp., RH & Air current Treatment CD ($P \leq 0.05$) pour Temp., HR & traitement par courant d'air	4		4		3.5		0.1		0.06		5	
Cooking method Méthode de cuisson	3		3		2.5		0.1		0.4		3	
Treat. × method	6		6		4.9		0.1		0.8		6	

* OP – Open pan cooking / Cuisson ouverte à la bassine. ** PC – Pressurised cooking / Cuisson pressurisée.

Komatsu (1975) has pointed out that Solubility of sericin in water is correlated with the structure of sericin and it decreases when the sericin molecules are transformed from random point to β structure and crystallized state. This transformation is influenced by the moisture content of sericin during spinning (Kataoka 1977). From the x-ray diffraction pattern study on the crystallinity of cocoon spun in the atmosphere of various relative humidity, Kataoka (1977) reported that as the relative humidity increases during cocoon spinning the crystallinity of sericin increases.

According to a Japanese investigation on impact of various factors during cocoon mounting on reelability with bivoltine hybrid cocoons of their origin, it is believed that the humidity and air flow during mounting has the maximum impact on reelability of cocoons more than temperature and other conditions maintained during mounting (Komatsu 1975).

Above discussions indicate that the structural changes that occur in sericin due to high humidity during cocoon spinning (particularly without air circulation) reduce the solubility of sericin. This in turn, results in under/uneven sericin swelling and softening during cooking and hence affects the reelability of cocoons severely. This is the reason why cocoon quality, particularly reelability, from the same race deteriorates during rainy season (with high humidity) and hence affects the reeling performance.

Significant reduction in filament length, non-broken filament length and raw silk % (Tables I and II) in the case of cocoons spun under high temperature and high humidity is attributed to very poor reelability in these conditions leading to increase in waste % because of frequent brushing.

Frequent brushing of cocoons because of poor reelability increases the brushing waste, leading to the removal of more number of outside filament layers which have coarse filament denier. Due to this the average cocoon filament length, non-broken filament length and cocoon filament denier have reduced significantly in the case of cocoons spun under high temperature and high humidity (Tables I and II).

Influence of Air Current on Reeling Performance:

Results indicate that (Tables I and II), air current (circulation) during cocoon spinning improves the reeling characteristics significantly. This is due to the fact that forced air circulation / ventilation will drive away the humidity in the cocoon mounting zone and facilitate quick removal of water content from the cocoon layers during spinning and thus helps in reducing the structural changes in sericin, thereby helping in reducing the adhesive strength of sericin depending upon the weather conditions. Because of this, there is a significant improvement in reelability, leading to significant improvement in raw silk recovery and raw silk %. From the results it can be inferred that the role of air circulation during cocoon spinning is very important, particularly when the humidity during cocoon spinning is on higher side for achieving better reeling characteristics.

Influence of temperature and Humidity on Quality of Raw Silk:

From the raw silk quality characteristics results (Table IV) it is to be observed that Neatness %, cleanness % and elongation characteristics of raw silk are significantly better in the case of cocoons spun under low temperature and low humidity conditions particularly with air circulation. Influence of temperature and humidity on these characteristics is observed to be highly significant at 1% level (Table V).

From the results (Table IV) it is observed that pressurised cooking method has resulted in significantly better quality characteristics of raw silk as compared to open pan method. This could be attributed to the better softening and swelling of sericin of all layers of cocoon filament of cocoon shell in case of pressurised cooking as compared to under cooking of cocoons in case of single pan, where cocoons are cooked at only one temperature for less duration than required. Results indicate that cocoon cooking has a significant role in achieving better quality silk. However, from the results it is observed that even with pressurised cooking technique some of the quality characteristics of raw silk are not satisfactory in case of cocoons spun under high temperature and high humidity conditions

particularly without air circulation as compared to the cocoons spun under low temperature and low humidity conditions.

Results indicate that (Table IV) cleanness, neatness of raw silk have got affected severely in case of cocoons spun under high temperature and high humidity conditions particularly without air circulations. This is due to improper/under softening and swelling (due to reduction in soluble nature) of sericin during cooking in case of cocoons produced under high humidity conditions, and this has resulted in occurrence of more cleanness and neatness defects such as loops, slugs and hairiness in the raw silk and hence reduced the cleanness and neatness of raw silk very significantly.

It is observed that (Table IV) tenacity and elongation of raw silk in the case of cocoons spun under high temperature and high humidity conditions are significantly less as compared to those of raw silk in the case of cocoons spun under low temperature and low humidity. It is to be noted that the relationship exists between the variation in cooking conditions, agglutination force between the sericin cross over points and cocoon filament exfoliation tension, which occurs when a cocoon filament is exfoliated from the cocoon layer during reeling (Takabayashi 1996). During unwinding of a cocoon filament, there will be stretch in the filament (particularly while it is being released from cross over points) which depends on the agglutination force between the cocoon filament and cocoon shell and cocoon cooking conditions. If this force is very high, the filament may break depending on the weak spots in the cocoon filament and cooking conditions and hence dropping of cocoon during reeling leading to reduction in reelability. Alternatively, the filament may be stretched beyond the yield point before it is released from the cross over points in the cocoon shell affecting the tensile properties of cocoon filament and thereby raw silk (Subhas 1996). Because of the very high agglutination force exists between cocoon filament and cocoon shell in case of cocoons spun under high humidity conditions, the tensile properties of raw silk produced from these cocoons have got affected severely. From the cohesion results (Table IV and V), it is observed that cohesion of raw silk is significantly (at 1 % level) influenced by the temperature and humidity conditions maintained during cocoon spinning. Results indicate that (Table IV) cohesion of raw silk reeled from cocoons spun under high temperature & humidity and pressurized cooking method is more than other conditions. It is to be noted that cohesion of raw silk is significantly influenced by (Subhas 1995) racial sericin character and proper softening and swelling of sericin during cooking. Results confirm that adhesive property of sericin is more in case of cocoons produced with high humidity as compared to that of cocoons produced with low humidity. Interestingly cohesion of raw silk reeled associated with open pan cooking from cocoons with high humidity is significantly lower (even though sericin of these cocoons has better adhesive property) than other conditions. This is due to the fact that hard and sticky sericin of high humidity cocoons cannot be softened easily and if such cocoons are improperly/under cooked with open pan, sericin will not be softened/swollen properly resulting in less cohesion of filaments in the raw silk. From the results it can be observed that cohesion of raw silk reeled associated with Pressurised cooking is good in all the conditions and significantly better than that of open pan cooking in all the cases. This is attributed to the proper softening and swelling of sericin in case of Pressurised cooking (Subhas 1995).

Influence of Air Current on Quality Characteristics of Raw silk:

From the results (Table- IV) it is observed that air current (circulation) has resulted in significant improvement in quality characteristics of raw silk both in case of cocoons spun under high humidity and low humidity.

This is due to the fact that forced air circulation / ventilation will drive away the humidity in the cocoon mounting zone and facilitate quick removal of water content from the cocoon layers during spinning and thus helps in reducing the structural changes in sericin, thereby helping in reducing the adhesive strength of sericin depending upon the weather conditions. Because of this, sericin of these cocoons has less resistance towards cocoon cooking and hence facilitates uniform cooking, leading to the improvement in quality of raw silk. Results indicate that the role of air circulation during cocoon

to the improvement in quality of raw silk. Results indicate that the role of air circulation during cocoon spinning is very important, particularly when the humidity during cocoon spinning is on higher side for achieving better quality characteristics of raw silk.

Table V. Analysis of variance of quality characteristics of raw silk.

Tableau V. Analyse de variance pour les caractéristiques de qualité de la soie grège.

	Mean Sum of Squares						
Treatment condition	Degree of Freedom	Neatness	Low neatness	Cleanness	Tenacity	Elongation	Cohesion
	Somme Moyenne des Carrés						
Condition de Traitement	Degrés de liberté	Netteté	Netteté minimum	Propreté	Résistance	Allongement	Cohésion
Tmp., RH & air current Tmp., HR & courant d'air	3	361.667**	516.396**	398.417**	0.146**	25.564**	1341.417**
Cooking method Méthode de cuisson	1	484**	430.563**	600.25**	0.452**	29.594**	7832.25**
Tmp., RH & Air current and cooking method Tmp., HR & courant d'air et méthode de cuisson	3	58**	33.062**	61.083**	0.02187**	1.892**	680.083**
Replication Répétition	1	12.250	18.063	25.000	0.0007562	0.931	42.250
Error / Ecart	7	5.964	6.634	4.286	0.003585	0.123	7.536

** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %*. * Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %*.
NS - Non significant / *Non significatif*.

As per the interaction of CSTR1 with reeling filatures and Cocoon market, during monsoon (particularly July to October) average Renditta increased by 0.5 to 1.0 and productivity of the filatures come down by 20-25% as compared to other seasons with the same race of cocoons because of high humidity in the atmosphere. This has tremendous influence on techno-economics of the filatures. In order to improve the cocoon quality in rainy season serious efforts and integrated approaches are very much essential from the extension staff of Sericulture industry in educating the farmers regarding importance of temperature and humidity management during cocoon spinning by constructing separate cocoon (spinning) mounting halls with well aeration/cross ventilation, using rotary mountages, air circulation fans, heaters etc. Such type of efforts will result in improving the cocoon

quality hence better price for the farmers and assist considerably the filatures in achieving better raw silk recovery, quality raw silk during monsoon.

CONCLUSION

From the results it can be inferred that temperature and humidity, particularly, humidity maintained during cocoon spinning has a direct bearing on reelability and hence raw silk yield, filament length and cocoon filament denier of cocoons and quality characteristics of raw silk. It is observed that high temperature and high humidity during cocoon spinning, particularly in the absence of air circulation affect very severely the reelability and hence reeling performance of cocoons. Reeling performance of cocoons and quality of raw silk are found to be very good in the case of cocoons spun under 27°C and 70% RH with air circulation of about 50 cm/s. Temperature and humidity maintained during cocoon spinning will influence the solubility of cocoon sericin, and hence its behavior during cocoon cooking, which in turn influences the reeling characteristics of cocoons and quality of raw silk. This is the reason why cocoon quality particularly reelability from the same race will get deteriorated during rainy season (with high humidity) and hence will affect the reeling performance and quality of raw silk. Results also indicate that air (current) circulation & proper ventilation during cocoon spinning under high humidity conditions improve the reeling performance and quality of raw silk significantly.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Dr. Dr. Rajan, Deputy Director, CSR&TI, Mysore for his assistance in the study. The Assistance of the staff of reeling division of CSTRI in carrying out reeling trials is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- TSUNEKO AKAHANE & K. TSUBOUCHI (1994) "Reelability and water content of cocoon layer during the spinning stage" *The Journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.63, Number 3, 229-234.
- SHANG TIAN WU (1976) "Management after cocooning process I-III, *Sericulture Science & Technology, Japan*, 15(9): 62-65, 15(10): 61-63, 15(11): 62-64.
- LIANG JAN ZHU, MITSUO ARAI & HIRABAYASHI.K (1995) "Relationship between adhesive properties and Structure of sericin in cocoon filaments" *The Journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.64, Number 5, 420-426.
- KOMATSU. K..(1975) "Studies on dissolution behavior and structural characteristics of silk sericin, *Bull. seric. Exp. Stat. Japan*, 26, 135-256.
- KATAOKA.K (1977) on the crystallinity of the cocoon sericin spun in the atmosphere of various relative humidity. *J.Seric. Sci.Japan*, 46(2) 169-170.
- TAKABAYASHI C, SUBHAS V NAIK & TSUBOI H (1996) "Influence of cocoon cooking conditions on variation of cocoon filament exfoliation tension" *Journal of sericultural science of Japan*, 65(4), 278-285.
- SUBHAS. V. NAIK, TAKABAYASHI, C. & SOMASHEKAR.T.H. (1996) "Influence of cocoon cooking conditions and Reeling speed on the reeling tension, tenacity and elongation of raw silk" *Sericologia* 36(2), 305-313.
- SUBHAS. V. NAIK, TAKABAYASHI.C., TSUBOI. H. & SOMASHEKAR.T.H (1995) "Influence of cocoon cooking temperature on Cohesion of raw silk" *Sericologia* 35(3), 513-520.

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE MAINTENUES PENDANT LE FILAGE DU COCON SUR LA PERFORMANCE DE DEVIDAGE ET LA QUALITE DE LA SOIE GREGE CHEZ LES COCONS HYBRIDES BIVOLTINS INDIENS

SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR

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

On a étudié la performance de dévidage des cocons et la qualité de la soie grège en rapport avec la température et l'humidité maintenues pendant le filage du cocon chez les cocons hybrides bivoltins. On maintient deux températures, c'est-à-dire 27 ° C et 30 ° C et des conditions d'humidité de 70 % et 90 %, avec circulation de l'air et sans circulation de l'air en utilisant SERICATRON pendant le filage des cocons par les vers à soie arrivés à maturité. Pour étudier l'interaction entre les conditions de cuisson et la qualité du cocon, d'après la performance de dévidage, on cuit les cocons en utilisant la méthode de cuisson ouverte à la bassine et la méthode de cuisson pressurisée. On dévide les cocons en utilisant le système de dévidage multibouts du Central Silk Technological Research Institute. Les résultats indiquent que les caractéristiques de dévidage, c'est-à-dire la dévidabilité, le rendement en soie grège et la qualité de la soie grège sont significativement meilleurs chez les cocons filés à basse température et dans des conditions de faible humidité par comparaison à ceux filés à température élevée et avec beaucoup d'humidité. Les conditions de température et d'humidité élevées, particulièrement sans circulation de l'air, ont des effets négatifs sur la dévidabilité, le rendement en soie grège, la netteté et la propreté de la soie grège et sur les propriétés de résistance de la soie grège. On observe aussi que la circulation de l'air pendant le filage du cocon améliore significativement la performance de dévidage et les caractéristiques de qualité de la soie grège, à la fois avec une humidité élevée et faible. On pourrait attribuer cela aux changements structuraux de la séricine avec une humidité élevée pendant le filage du cocon, qui entraîne l'augmentation de la résistance au décolage du filament du cocon. L'étude indique clairement que la température et l'humidité maintenues et la circulation de l'air pendant le filage du cocon ont un effet direct sur la dévidabilité et, donc, sur le rendement en soie grège des cocons et sur la qualité de la soie grège.

INTRODUCTION

Le ramollissement et le gonflement uniformes et corrects de la séricine pendant la cuisson du cocon dépendent des caractéristiques de la séricine, de l'étouffement et des conditions de cuisson des cocons. Il n'est possible de dérouler le filament du cocon à partir de la coque soyeuse sans problème que lorsque la séricine de toutes les couches des cocons est ramollie au niveau requis de manière uniforme. Des études ont été réalisées au Japon pour comprendre l'influence de la température et de l'humidité pendant l'étape du filage du cocon sur la dévidabilité (Akahane 1994, Shang Tiang Wu, 1976). Mais les informations disponibles sur l'influence de la température et de l'humidité maintenues pendant le filage du cocon sur la performance de dévidage, c'est-à-dire sur la rentrée de soie grège, sur le % de déchets et sur la qualité du fil, en l'occurrence sur les propriétés de propreté, de netteté et de résistance de la soie grège et sur la cohésion de la soie grège sont rares, particulièrement chez les cocons hybrides bivoltins indiens, c'est pourquoi nous avons entrepris cette étude.

MATERIELS ET METHODES

Matières premières :

On élève des cocons hybrides bivoltins (CSR2 × CSR5) dans des conditions identiques. On divise les vers à soie mûrs sains en quatre lots et on les conserve séparément pour le filage du cocon dans différents SERICATRONs. Pendant le filage des cocons (72 heures), on maintient les conditions de température et d'humidité suivantes.

Lot I :	Temp 30° C et 90 % d'HR (sans circulation de l'air)
Lot II :	Temp 30° C et 90 % d'HR (avec une circulation de l'air d'environ 50 cm/sec)
Lot III :	Temp 27° C et 90 % d'HR (sans circulation de l'air)
Lot IV :	Temp 27° C et 90 % d'HR (avec une circulation de l'air d'environ 50 cm/sec)

On recueille les cocons séparément pour chaque lot au bout de 6 jours. On évalue les caractéristiques des cocons.

Etouffage des cocons :

On étouffe les cocons dans un étouffoir à air chaud en vrac, au niveau optimum, en utilisant un profil de température de 115° C à 55° C pendant 5 heures.

Cuisson des cocons :

On divise à nouveau les cocons de chaque lot en deux parties et on les cuit en utilisant une méthode de cuisson ouverte à la bassine ou une méthode de cuisson pressurisée.

Cuisson ouverte à la bassine :

On cuit les cocons à une température d'ébullition pendant 3 minutes, puis on prend les cocons pour procéder au dévidage.

Cuisson pressurisée :

On cuit les cocons en utilisant une machine de cuisson pressurisée du CSRTI en employant le profil de température et de durée suivant.

Temp. et durée de rouissage	70° C	120 s.
Température et durée élevées pour l'imprégnation	90° C	120 s.
Imprégnation dans l'eau à basse température et durée	75° C	60 s.
Température et durée de cuisson à la vapeur	97° C	120 s.
Température et durée d'ajustement	96° C à 75° C	4 min.
Temp et durée de finition	45° C	45 secs
Purgeage des cocons cuits à	80° C	

Dévidage :

On procède au dévidage des échantillons de cocons sur une machine de dévidage multibouts du CSRTI en utilisant une vitesse de dévidage de 100 m/min, une température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C et une longueur de croisure de 8 cm.

Qualité de l'eau :

Pour l'étude, on utilise une eau à un pH de 7,1, une dureté de 70 ppm et une alcalinité de 100 ppm.

Caractéristiques de dévidage :

D'après les résultats, on calcule les caractéristiques de dévidage, c'est-à-dire la dévidabilité, la rentrée de soie grège, le % de soie grège et le % de déchets par rapport au poids de la soie.

Test de la soie grège :

On teste les caractéristiques de propreté, de netteté, de netteté minimum et de cohésion des échantillons de soie grège en utilisant un testeur Sérplane et un testeur de cohésion. Par ailleurs, on teste la résistance et l'allongement de la soie grège à un taux d'allongement constant sur un testeur de résistance Instron (Modèle 5500 R) lié à un ordinateur, en suivant la procédure habituelle.

RESULTATS ET DISCUSSIONS**Influence de la température et de l'humidité sur les caractéristiques de dévidage :**

Les résultats moyens concernant l'influence de la température et de l'humidité sur les résultats de la performance de dévidage sont présentés dans les Tableaux I et II. Les résultats de l'analyse de variance sont présentés dans le Tableau III. Les résultats (Tableaux I et II) indiquent que la dévidabilité, la longueur du filament, le % de soie grège sont significativement meilleurs dans le cas des cocons filés en maintenant une température et une humidité faibles, par comparaison à ceux filés sous une température et une humidité élevées. La température et l'humidité élevées (en particulier sans circulation de l'air) ont des conséquences très négatives sur la dévidabilité, sur la longueur du filament, sur la longueur du filament sans casse et sur le % de soie grège.

On observe que l'influence de la température et de l'humidité sur la dévidabilité, sur la longueur moyenne du filament, sur la longueur du filament sans casse, sur le titre du filament de cocon, sur le % de soie grège, et sur le % de déchets par rapport au poids de la soie, est très significative au seuil de 1 %. D'après les valeurs DC (Tableaux I et II), on observe que la différence entre les traitements pour les caractéristiques de dévidage est significative au seuil de 1 %.

Les résultats (Tableaux I et II) indiquent que la méthode de cuisson pressurisée donne significativement une meilleure performance de dévidage, par comparaison à la méthode de cuisson ouverte à la bassine. On pourrait attribuer cela aux meilleurs amollissement et gonflement de la séricine dans toutes les couches du filament du cocon de la coque soyeuse dans le cas de la cuisson pressurisée (en utilisant le principe de cuisson du CSRTI), par comparaison à la sous-cuisson des cocons dans le cas de la bassine ouverte, où on ne cuit les cocons qu'à une seule température pendant une durée inférieure à ce qui est nécessaire. Les résultats indiquent que la cuisson du cocon joue un rôle significatif pour obtenir une meilleure performance de dévidage. Cependant, d'après les résultats (Tableaux I et II), on peut observer que même avec une technique de cuisson pressurisée, les résultats de la performance de dévidage ne sont pas satisfaisants, dans le cas de cocons filés dans des conditions de température et d'humidité élevées, particulièrement sans circulation de l'air, par comparaison aux cocons filés dans des conditions de température et d'humidité faibles.

La diminution significative de la dévidabilité, du % de soie grège et l'augmentation significative du % de déchets des cocons filés dans des conditions de température et d'humidité élevées, pourraient être attribuées aux changements structurels de la séricine. Akahane et coll., (1994) ont établi une relation entre la teneur en eau de la couche du cocon pendant l'étape du filage et la dévidabilité des cocons. Leur étude avec les cocons hybrides d'origine japonaise indique que la teneur en eau dans les couches de cocon pendant le filage du cocon est significativement plus élevée quand l'humidité est plus importante par comparaison à celle obtenue lorsque l'humidité est inférieure ; en conséquence, la dévidabilité des cocons est mauvaise avec une humidité élevée. Ils ont recommandé que la teneur en eau de la couche soyeuse soit inférieure à 20 % pendant le filage du cocon, pour obtenir une bonne dévidabilité. Ils ont signalé qu'une teneur plus élevée en eau (à cause du retard de l'évaporation) dans les couches de la coque soyeuse pendant le filage du cocon diminue la dévidabilité des cocons. Cela signifierait que le faible taux d'évaporation de la teneur en eau des couches de cocon pendant le filage du cocon influencerait la structure de la séricine. On doit noter que quand l'humidité (des conditions ambiantes) est élevée pendant le filage du cocon, l'eau présente dans la solution de filage, dans l'urine du ver à soie et dans les excréments du ver à soie, s'évapore lentement, ce qui

influence la structure de la séricine. On peut s'attendre à ce que cela diminue la solubilité de la séricine et que cela augmente la force d'agglutination entre le filament du cocon et la coque soyeuse. A son tour, cela entraînerait la diminution du gonflement et du ramollissement de la séricine pendant la cuisson, ce qui affecterait la dévidabilité. Pour obtenir une bonne dévidabilité, il est donc essentiel de retirer / de faire évaporer rapidement l'eau du filament pendant le filage du cocon.

Liang Jan Zhu (1995) a souligné que, la résistance au décollage du filament des cocons (pendant le déroulement) est faible chez les cocons filés dans des conditions de température et d'humidité faibles, en raison de la présence d'une structure en pelote statistique de la séricine et de la résistance au décollage (et donc de la force adhésive de la séricine) qui est plus importante dans le cas des cocons filés dans des conditions de température et d'humidité élevées, parce que la molécule de séricine dans la solution passe d'une pelote statistique à une structure β en raison du retard dans l'assèchement de la séricine.

Komatsu (1975) a souligné que la solubilité de la séricine dans l'eau est corrélée avec la structure de la séricine et elle baisse quand les molécules de séricine se transforment d'une pelote statistique à une structure β et à un état cristallisé. Cette transformation est influencée par la teneur en eau de la séricine pendant le filage (Kataoka, 1977). D'après l'étude de la cristallinité du cocon filé dans différentes humidités relatives, par la diffraction aux rayons X, Kataoka (1977) a observé que lorsque l'humidité relative augmente pendant le filage du cocon, la cristallinité de la séricine augmente.

Selon une étude japonaise avec des cocons hybrides bivoltins japonais, sur l'impact de facteurs variés pendant la montée sur la dévidabilité, on pense que l'humidité et le flux d'air pendant la montée ont l'impact maximum sur la dévidabilité des cocons, plus que la température et d'autres conditions maintenues pendant la montée (Komatsu, 1975).

Les discussions ci-dessus montrent que les changements structurels qui se produisent dans la séricine à cause de l'humidité élevée pendant le filage du cocon (particulièrement sans circulation de l'air) diminuent la solubilité de la séricine. Cela, à son tour, entraîne le manque de gonflement et d'amollissement ou le gonflement et l'amollissement irréguliers de la séricine pendant la cuisson et cela a donc des conséquences très négatives sur la dévidabilité des cocons. C'est la raison pour laquelle la qualité du cocon, en particulier la dévidabilité de la même race, se détériore pendant la saison des pluies (avec une humidité élevée) et que cela affecte la performance de dévidage.

On attribue la diminution significative de la longueur du filament, de la longueur du filament sans casse et du % de soie grège (Tableaux I et II) des cocons filés à une température et une humidité élevées à la très mauvaise dévidabilité dans ces conditions, qui entraîne une augmentation du % de déchets à cause du purgeage fréquent.

Le purgeage fréquent des cocons, à cause de la mauvaise dévidabilité, augmente les déchets de purgeage, ce qui entraîne le rejet d'un plus grand nombre de couches externes du filament, qui ont un titre de filament épais. A cause de cela, la longueur moyenne du filament de cocon, la longueur moyenne du filament sans casse et le titre moyen du filament de cocons diminuent significativement chez les cocons filés sous une humidité et une température élevées (Tableaux I et II).

Influence du courant d'air sur la performance de dévidage :

Les résultats indiquent que (Tableaux I et II), le courant d'air (circulation) pendant le filage du cocon améliore significativement les caractéristiques de dévidage. Cela est dû au fait que la circulation / la ventilation forcées de l'air chassent l'humidité dans la zone de montée des cocons, ce qui facilite le retrait rapide de la teneur en eau des couches du cocon pendant le filage et cela contribue donc à diminuer les changements structurels de la séricine, ce qui aide donc à diminuer la force adhésive de la séricine en fonction des conditions météorologiques. Grâce à cela, il y a une augmentation significative de la dévidabilité, ce qui entraîne une amélioration significative de la rentrée de soie grège et du % de soie grège. D'après les résultats, on peut en déduire que le rôle de la circulation de l'air pendant le filage du cocon est très important, particulièrement quand l'humidité pendant le filage du cocon est plutôt élevée, pour obtenir de meilleures caractéristiques de dévidage.

Influence de la température et de l'humidité sur la qualité de la soie grège :

D'après les résultats concernant les caractéristiques de qualité de la soie grège (Tableau IV), on doit observer que le % de netteté, le % de propreté et les caractéristiques d'allongement de la soie grège sont significativement meilleures pour les cocons filés dans des conditions de température et d'humidité faibles, particulièrement avec une circulation de l'air. On observe que l'influence de la température et de l'humidité sur ces caractéristiques est très significative au seuil de 1 % (Tableau V).

D'après les résultats (Tableau IV), on observe que la méthode de cuisson pressurisée donne des caractéristiques de qualité de la soie grège significativement meilleures, par comparaison à la méthode à la bassine ouverte. On pourrait attribuer cela aux meilleurs amollissement et gonflement de la séricine de toutes les couches des filaments de la coque soyeuse avec la cuisson pressurisée, par comparaison à la sous-cuisson des cocons dans le cas d'une bassine unique, où on ne cuit les cocons qu'à une seule température pendant une durée inférieure à ce qui est nécessaire. Les résultats indiquent que la cuisson des cocons joue un rôle significatif pour obtenir une soie de meilleure qualité. Cependant, d'après les résultats, on observe que même avec une technique de cuisson pressurisée, certaines des caractéristiques de qualité de la soie grège ne sont pas satisfaisantes pour les cocons filés dans des conditions de température et d'humidité élevées, particulièrement sans circulation de l'air, par comparaison aux cocons filés dans des conditions de faibles température et d'humidité.

Les résultats (Tableau IV) indiquent que le filage des cocons dans des conditions de température et d'humidité élevées ont des conséquences très négatives sur la propreté, la netteté de la soie grège, particulièrement sans circulation de l'air. Cela est dû au ramollissement et au gonflement incorrects / au manque de ramollissement et de gonflement (en raison de sa nature soluble) de la séricine pendant la cuisson des cocons produits dans des conditions d'humidité élevée et cela entraîne plus de défauts de propreté et de netteté, tels que des boucles, des costes et une soie grège qui peluche, ce qui diminue donc significativement la propreté et la netteté de la soie grège.

On observe que (Tableau IV) la ténacité et l'allongement de la soie grège des cocons filés dans des conditions de température et d'humidité élevées sont significativement inférieurs, par comparaison à ceux obtenus pour la soie grège provenant de cocons filés avec de basses température et humidité. On doit noter qu'il existe une relation entre la variation des conditions de cuisson, la force d'agglutination entre les points de croisement de la séricine et la tension d'exfoliation du filament du cocon, qui se produit quand un filament de cocon est exfolié de la couche de cocon pendant le dévidage (Takabayashi, 1996). Pendant le déroulement du filament du cocon, le filament est étiré (particulièrement pendant qu'il est libéré des points de croisement), ce qui dépend de la force d'agglutination entre le filament du cocon et la coque soyeuse et des conditions de cuisson du cocon. Si cette force est très élevée, le filament peut se casser en fonction des points faibles du filament du cocon et des conditions de cuisson, d'où les cassures du cocon pendant le dévidage, ce qui entraîne la diminution de la dévidabilité. Alternativement, le filament peut être étiré au-delà du point de rendement, avant qu'il ne soit libéré des points de croisement de la coque soyeuse, ce qui a un effet négatif sur les propriétés de résistance du filament du cocon et donc de la soie grège (Subhas, 1996). A cause de la force d'agglutination très importante qui existe entre le filament du cocon et la coque soyeuse chez les cocons filés avec une humidité élevée, les propriétés de résistance de la soie grège produite à partir de ces cocons sont sérieusement affectées. D'après les résultats de la cohésion (Tableaux IV et V), on observe que la cohésion de la soie grège est significativement influencée (au seuil de 1 %) par les conditions de température et d'humidité maintenues pendant le filage du cocon. Les résultats (Tableau IV) indiquent que la cohésion de la soie grège dévidée à partir de cocons filés sous une température et une humidité élevées et avec la méthode de cuisson pressurisée est plus importante que dans d'autres conditions. On doit noter que la cohésion de la soie grège est significativement influencée (Subhas, 1995) par le caractère racial de la séricine et par l'amollissement et le gonflement corrects de la séricine pendant la cuisson. Les résultats confirment que la propriété d'adhésion de la séricine est plus importante pour les cocons produits avec une

humidité élevée, que pour ceux produits avec une faible humidité. De manière intéressante, la cohésion de la soie grège dévidée, associée à une cuisson ouverte à la bassine des cocons avec une humidité élevée est significativement inférieure (bien que la sérécine de ces cocons ait de meilleures propriétés d'adhésion) aux autres conditions. Cela est dû au fait que la sérécine dure et collante des cocons filés avec une humidité élevée ne peut pas se ramollir facilement et si ces cocons sont mal cuits / ou insuffisamment cuits dans une bassine ouverte, la sérécine ne ramollit / ne gonfle pas correctement, ce qui entraîne moins de cohésion des filaments de la soie grège. D'après les résultats, on peut observer que la cohésion de la soie grège dévidée associée avec une cuisson pressurisée, est bonne dans toutes les conditions et significativement meilleure qu'avec une cuisson ouverte à la bassine. On attribue cela à l'amollissement et au gonflement corrects de la sérécine obtenus avec une cuisson pressurisée (Subhas, 1995).

Influence du courant d'air sur les caractéristiques de qualité de la soie grège :

D'après les résultats (Tableau IV), on observe que le courant d'air (circulation) entraîne une amélioration significative des caractéristiques de qualité de la soie grège à la fois pour les cocons filés avec une humidité élevée et faible.

Cela est dû au fait que la circulation / la ventilation forcées de l'air chasse l'humidité dans la zone de montage des cocons, ce qui facilite le retrait facile de la teneur en eau des couches du cocon pendant le filage et aide donc à diminuer les changements structurels de la sérécine, ce qui contribue à diminuer la force d'adhésion de la sérécine qui dépend des conditions météorologiques. Grâce à cela, la sérécine de ces cocons a moins de résistance pendant la cuisson des cocons, ce qui facilite donc une cuisson uniforme et améliore la qualité de la soie grège. Les résultats indiquent que le rôle de la circulation de l'air pendant le filage des cocons est très important, en particulier quand l'humidité pendant le filage du cocon est plutôt élevée, ceci afin d'obtenir de meilleures caractéristiques de qualité de la soie grège.

Suite à l'interaction du CSTRI pendant la mousson (particulièrement de juillet à octobre) auprès des filatures et du Marche aux Cocons, le rendement moyen à la bassine a augmenté de 0,5 à 1 et la productivité des filatures a baissé de 20 à 25 % par comparaison aux autres saisons avec la même race de cocons, à cause de l'humidité élevée dans l'atmosphère. Cela a une influence énorme sur la techno-économie des filatures. Pour améliorer la qualité du cocon pendant la saison des pluies, des efforts sérieux et des approches intégrées sont essentiels de la part du personnel de vulgarisation de l'industrie sérécicole pour éduquer les fermiers sur l'importance de la gestion de la température et de l'humidité pendant le filage du cocon, par la construction de halls séparés de montée (filage) des cocons avec une bonne aération / ventilation, par l'utilisation d'encabanages rotatifs, de ventilateurs pour la circulation de l'air, de chauffages etc... De tels efforts permettront l'amélioration de la qualité des cocons et donc de meilleurs prix pour les fermiers et aideront considérablement les filatures à obtenir une meilleure rentrée et qualité de soie grège pendant la mousson.

CONCLUSION

D'après les résultats, on peut en déduire que la température et l'humidité, en particulier l'humidité maintenue pendant le filage du cocon, ont une incidence directe sur la dévidabilité et donc sur le rendement en soie grège, sur la longueur du filament et sur le titre du filament des cocons et sur les caractéristiques de la soie grège. On observe que la température et l'humidité élevées pendant le filage du cocon, en particulier en absence de circulation de l'air, a un effet très négatif sur la dévidabilité et donc sur la performance de dévidage des cocons. La performance de dévidage des cocons et la qualité de la soie grège s'avèrent très bonnes chez les cocons filés à 27° C et avec 70 % d'HR avec une circulation de l'air d'environ 50 cm / s. La température et l'humidité maintenues pendant le filage du cocon influencent la solubilité de la sérécine du cocon et donc son comportement pendant la cuisson du cocon, ce qui à son tour influence les caractéristiques de dévidage des cocons et la qualité de la

soie grège. C'est la raison pour laquelle la qualité des cocons, en particulier la dévidabilité de la même race, est détériorée pendant la saison des pluies (avec une humidité élevée) et cela affecte la performance de dévidage et la qualité de la soie grège. Les résultats indiquent aussi que la circulation de l'air (courant) et la ventilation correctes pendant le filage des cocons, avec des conditions d'humidité élevée, améliorent significativement la performance de dévidage et la qualité de la soie grège.

GENETIC DIVERGENCE ANALYSIS IN MULBERRY

H. V. VENKATESHAIAH, R. S. MALLIKARJUNAPPA*, M. S. ESWAR RAO,
U. D. BONGALE & M. N. ANANTHARAMAN

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore 560 062, India.

Sixty one mulberry germplasm genotypes (25 indigenous and 36 exotic) were evaluated and pooled data of 9 trials over 3 years (1999-2002) for 10 characters was subjected to genetic divergence analysis. The heritability coefficients indicated that characters like fresh weight of 100 leaves, leaf yield / plant and sprouting and rooting of cuttings were highly heritable (> 95 %). The 61 genotypes were grouped into 6 clusters, indicating the existence of considerable diversity. Maximum number of genotypes (30) were under cluster I, followed by cluster II (21), cluster III (6) and cluster IV (2) whereas cluster V and VI were with a single genotype. The grouping pattern indicated that 3 clusters were heterogenous with respect to geographical origin of the genotypes. The variables such as rooting, leaf yield and fresh weight of 100 leaves, sprouting and number of branches / plant were the most potential characters contributing maximum to the total genetic divergence. Intra-cluster D^2 values varied from 0 to 6.063 and inter-cluster D^2 values varied from 7.066 to 13.910. The clusters III and V and VI were highly divergent. The genotypes, Accns. 273, 281, 270, 331 and 313 from cluster III, Accn. 308 from cluster V and Accn. 280 from cluster VI were found to be most promising and hence, may be used in hybridization programmes for mulberry improvement.

Keywords: Mulberry germplasm, genetic divergence, intra- and inter-clusters, heritability coefficients.

INTRODUCTION

Leaf of mulberry (*Morus* L., Moraceae Link) is the exclusive food source of silkworms (*Bombyx mori* L.). Being perennial, deep-rooted, fast growing and high biomass producing foliage plants, mulberry genotypes exhibit wide genetic variability and agro-climatic adaptability. With the mulberry cultivation spreading to different geographical areas in the country, the demand for superior, as well as location-specific mulberry cultivars is ever increasing. To cater to this demand, large scale long-ranging breeding programmes are necessary. For any breeding program, germplasm becomes the most valuable reservoir in providing variability for various traits (Singh and Sigh, 2002). In order to choose diverse parents and to utilize them in hybridization programs, divergence analysis by Mahalanobis D^2 statistic has been extensively used in quantifying the degree of genetic divergence among the parents in numerous crops (Bartual et coll., 1985). Information is available on genetic divergence and its utilization in mulberry breeding (Tikader et al., 2004 . Rahman et al., 2005). Present study was carried out to assess the amount of genetic diversity among a batch of 61 mulberry genotypes to identify suitable parents for mulberry improvement programmes.

* For correspondence.

MATERIALS AND METHODS

The 61 mulberry genotypes (25 indigenous and 36 exotic) used for present study were acquired by field collections and exchange of genetic materials among Scientific Institutions.

These genotypes were maintained in the field genebank at main campus of the Institute (Mallikarjunappa *et al.*, 1995). Data were recorded on propagation characters like sprouting and rooting of cuttings, growth and yield characters like plant height, number of branches / plant, internode length, fresh weight of 100 leaves, lamina-petiole ratio by weight and leaf yield / plant / harvest and quality characters like leaf-water content and leaf-water retention at 6 hr after harvest. The mean performance of individual genotypes over 9 trials of 3 years (1999-2002) was pooled and used for statistical analysis.

Analysis of variance was carried out for all the characters (Singh and Choudhary, 1995; Sharma, 1988). Contribution of each of the characters for divergence is calculated based on the ranks assigned to them. The ranks are computed using the ratio $d_i = Y_i^j - Y_i^k$ where Y_i is the value obtained for a character and superscripts j & k are the genotypes. Using these ranks percentages are calculated to understand the contribution of individual character towards divergence. Further estimation of heritability (h^2) in broad sense and genetic advance (%), which are the important selection parameters helpful for predication of gain under selection was made. Heritability, h^2 is computed using the ratio $\frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_p}$ where σ^2_p is the phenotypic and σ^2_g is the genotypic variance of a character. Genetic advance

is computed using the relation $(\frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_p} \times K) \times 100$ where K is the standardised selection differential

(tabulated values at a specific selection intensity). The genetic advance as percentage of mean is also computed to know the importance of selection of a specific character, which is calculated using the relation $\frac{\text{genetic advance}}{\text{mean}} \times 100$ (Singh and Choudhary, 1955; Sharma, 1988). Divergence analysis was

carried out using Mahalanobis D^2 statistic (Mahalanobis, 1936). The genotypes were grouped into different clusters following the Tocher's method as described by Rao (1952).

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of variance showed highly significant differences among the genotypes and the seasons for all the considered 10 characters, indicating the existence of genetic variability among the studied genotypes. Heritability coefficients indicated that characters such as sprouting and rooting of cuttings, fresh weight of 100 leaves and leaf yield / plant were highly heritable (> 95 %) and the number of branches / plant, internode length, plant height and lamina-petiole ratio by weight have moderate heritability of 89 to 94 % (Table I).

Based on the relative magnitude of D^2 values, 61 genotypes were segregated into 6 clusters (Table III). Maximum number of genotypes (30) were represented in the cluster I, followed by cluster II, cluster III and cluster IV with 21, 6 and 2 genotypes, respectively. Cluster V and VI were unique with only one genotype each. The grouping pattern indicated that 3 clusters were heterogenous with respect to origin of the genotypes. Similar observations were made by Mallikarjunappa *et al.*, (2000). It indicated that the genotypes from different geographic regions, do not necessarily give good recombinants and therefore genotypes should be evaluated on the basis of their individual merit and genetic diversity (Joshi and Rana, 1997). According to Murty and Arunachalam (1966) the genetic drift and selection in different environments could cause greater diversity than the geographic distance. The clustering of genotypes from different eco-geographical locations into one cluster could be attributed to possible free exchange of breeding materials or even varieties from one place to another (Sharma and Hore, 1997).

Table I. Mean sum of squares for 10 characters, heritability and contribution of different characters to total genetic diversity in mulberry.

Tableau I. Somme moyenne des carrés pour 10 caractères, hérabilité et contribution de différents caractères à la diversité génétique totale chez le mûrier.

Character	Mean	Genotypes (d. f. 123)	Contribution (%)	Heritability (h^2)	Genetic advance (%)	Genetic advance as % of mean
Caractère	Moyenne			Héritabilité (h^2)	Avance génétique (%)	Avance génétique en tant que % de la moyenne
Plant height (cm) / Hauteur du plant (cm)	167.91	12430.32	1.80	0.922	70.62	42.05
No. of branches / plant / Nbre de branches / plant	15.51	250.73	8.35	0.945	10.28	66.28
Internode length (cm) / Longueur de l'entre-noeud (cm)	4.93	4.55	1.86	0.927	1.36	27.55
Fresh weight of 100 leaves (g) Poids frais de 100 feuilles (g)	471.39	292699.45	15.19	0.968	359.43	75.26
Lamina:petiole ratio by weight (%) Ratio limbe : pétiole au poids (%)	8.17	20.83	2.13	0.889	2.79	34.11
Leaf-water content (%) / Teneur en eau de la feuille (%)	75.26	37.21	0.40	0.618	2.59	3.44
Leaf-water retention at 6 hr after harvest (%) Rétention de l'eau de la feuille 6 h après la récolte (%)	89.41	91.83	0.82	0.659	4.34	4.85
Sprouting (%) / Bourgeonnement (%)	66.1	5216.07	13.28	0.955	47.35	71.63
Rooting (%) / Racinement (%)	36.51	6722.11	39.78	0.985	36.09	98.87
Leaf yield / plant / harvest (kg) Rendement en feuilles / plant / récolte (kg)	0.69	1.00	16.34	0.966	0.67	96.63

Table II. Distribution of 61 mulberry genotypes in 6 clusters based on D^2 values.Tableau II. Distribution de 61 génotypes de mûrier dans 6 groupes d'après les valeurs D^2 .

Cluster	No. of genotypes in a cluster	Genotypes with origin
Groupe	Nbre de génotypes dans un groupe	Génotypes et origine
I	30	Indigenous – 7 and exotic- 23 (from 5 countries) 7 Indigènes et 23 exotiques (de 5 pays)
II	21	Indigenous -9 and exotic – 12 (from 4 countries) 9 Indigènes et 12 - exotiques (de 4 pays)
III	06	Accn. 313, Accn. 331, Accn. 281, Accn. 273 & Accn. 270 (indigenous / indigènes) & Accn. 274 (Japan / Japon)
IV	02	Accn. 275 & Accn. 279 (Indigenous / Indigènes)
V	01	Acc. 308 (Indigenous / Indigène)
VI	01	Accn 280 (Indigenous / Indigène)

Table III. Average intra (in bold) and inter-cluster D^2 values in 6 clusters of mulberry germplasm.Tableau III. Valeurs D^2 moyennes intra (en gras) et inter groupes dans 6 groupes de germoplasmes de mûrier.

Cluster Groupe	I	II	III	IV	V	VI
I	5.022	7.066	7.843	7.822	9.339	8.168
II		4.760	10.358	7.395	7.433	11.691
III			6.063	10.422	13.837	8.217
IV				2.896	8.686	11.717
V					0	13.910
VI						0

Table IV. Cluster mean values of 10 characters in mulberry.

Tableau IV. Valeurs moyennes des groupes pour 10 caractères chez le mûrier.

Character	I	II	III	IV	V	VI
Caractère	30	21	06	02	01	01
	Genotypes	Genotypes	Genotypes	Genotypes	Genotype	Genotype
Plant height (cm) <i>Hauteur du plant (cm)</i>	149.92 ± 40.37*	201.63 ± 37.38	153.98 ± 44.78	189.10 ± 36.50	182.94 ± 8.94	59.24 ± 48.11
No. of branches / plant <i>Nbre de branches / plant</i>	12.88 ± 4.76	18.07 ± 7.31	14.44 ± 3.85	29.00 ± 7.47	28.78 ± 8.27	6.78 ± 0.67
Internode length (cm) <i>Longueur de l'entre-noeud (cm)</i>	4.76 ± 0.59	5.07 ± 0.46	6.12 ± 1.37	4.38 ± 0.66	3.53 ± 0.33	2.60 ± 2.04
Fresh weight of 100 leaves (g) <i>Poids frais de 100 feuilles (g)</i>	448.70 ± 152.23	447.67 ± 186.59	761.48 ± 220.08	293.24 ± 72.99	102.68 ± 14.92	633.83 ± 271.75
Lamina : petiole ratio by weight (%) <i>Ratio limbe : pétiole au poids (%)</i>	7.86 ± 1.77	8.14 ± 1.69	10.83 ± 1.91	6.92 ± 1.20	6.77 ± 0.78	6.11 ± 1.04
Leaf-water content (%) <i>Teneur en eau de la feuille (%)</i>	75.10 ± 2.50	75.62 ± 2.52	76.82 ± 2.28	75.23 ± 1.70	71.63 ± 1.60	67.06 ± 25.22
Leaf water retention at 6 hr after harvest (%) <i>Rétention de l'eau de la feuille Au bout de 6 h après la récolte (%)</i>	90.00 ± 4.05	89.45 ± 5.04	90.84 ± 3.59	85.67 ± 5.65	78.56 ± 2.83	80.98 ± 30.54
Sprouting (%) <i>Bourgeonnement (%)</i>	63.24 ± 25.31	80.16 ± 17.82	29.73 ± 32.28	84.28 ± 16.33	89.78 ± 14.27	14.89 ± 20.05
Rooting (%) / Racinement (%)	24.46 ± 22.39	62.62 ± 17.17	0.85 ± 1.61	16.33 ± 8.48	80.67 ± 15.52	0.00 ± 0.00
Leaf yield / plant / harvest <i>Rendement foliaire / plant / récolte</i>	0.49 0.21	0.96 ± 0.35	0.66 ± 0.33	1.26 ± 0.32	0.04 ± 0.08	0.43 ± 0.14

* Mean ± standard deviation over genotypes and replications. / Moyenne ± écart type par rapport aux génotypes et aux répétitions.

The intra-cluster D^2 values ranged from 0 to 6.063 (Table III). The highest intra-cluster D^2 values were recorded in cluster III (6.063), followed by cluster I (5.022). Inter-cluster D^2 values ranged from 7.066 to 13.910 (Table III). Highest inter-cluster D^2 values were observed between clusters V and VI (13.910) and clusters III and V (13.837) indicating that the genotypes coming under these clusters have maximum divergence. The least inter-cluster D^2 values were recorded between clusters I and II

(7.066). It is, hence, suggested that genotypes of different clusters with maximum distance can be selected for hybridization programs (Singh and Singh, 2002 ; Rahman *et al.*, 2005).

The relative contribution of different characters towards total genetic divergence was calculated by using Mahalanobis D^2 divergence (Table I). The rooting character contributed the maximum (39.78%), followed by leaf yield (16.34%), fresh weight of 100 leaves (15.19%), sprouting (13.28%) and number of branches / plant (8.35%). The least contribution was from lamina-petiole ratio by weight (2.13%), followed by internode length (1.86%), plant height (1.80%), leaf-water retention after 6 hr of harvest (0.82%) and leaf water content (0.40%). Thus, the major contributing variables such as rooting, leaf yield, fresh weight of 100 leaves, sprouting and number of branches / plant can be given greater importance in selection of potential parents for hybridisation programmes (Mallikarjunappa *et al.*, 2002).

Considerable variation in cluster mean values was observed for all the 10 characters (Table IV). The cluster III contains highest values for characters fresh weight of 100 leaves, leaf-water content and leaf-water retention and the promising genotype in this cluster was Accn 281. Cluster V contains highest values for sprouting and rooting characters and the promising genotype identified in this cluster was Accn. 308. These two clusters have also exhibited very high genetic divergence (13.83). Hence, they could be considered for the hybridization in order to obtain good leaf yield along with high sprouting, rooting, number of leaves and internode distance and leaf-water retention. The inter-cluster distance in respect of clusters V and VI is the highest (13.91). The genotypes falling under these two clusters are Accns. 308 and 280, respectively. Accn. 308 is good in plant height (182.94 cm), number of branches / plant, sprouting and rooting and Accn. 208 is good in internode length, fresh weight of 100 leaves and leaf-water retention. Hence, these two genotypes make good pair for 7 characters out of 10 studied. The leaf yield is a dependent character mainly related to fresh weight of 100 leaves and leaf-water content. Accns. 281, 331 and 273 of cluster III are exceptionally good in respect of these two characters. Hence, these genotypes will contribute for the high leaf yields and thus could be considered in the improvement programme. It is concluded that Accns. 273, 281, 331 and 308 could be utilized for hybridization programmes for higher leaf yields and Accn. 308 for plant height, number of branches / plant, sprouting / rooting and Accn. 280 for internode length, fresh weight of 100 leaves and leaf-water retention.

REFERENCES

- BARTUAL R., CARBONELL E. A. & GREEN D. F. (1985) Multivariate analysis of a collection of soybean cultivars for southwestern Spain. *Euphytica*, 34: 113-123.
- JOSHI B. D. & RANA J. C. (1997) Genetic divergence in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Indian J. Agric. Sci.*, 67: 30-32.
- MAHALANOBIS P. C. (1936) On the generalized distance in statistics. *Proc. Nat. Inst. Sci. India*, 12: 49-55.
- MALLIKARJUNAPPA R. S., DANDIN S. B. & BONGALE U. D. (1995) Conservation of mulberry gene pool through field planting (IN): SHARMA B., KULSHRESHTHA V. P., GUPTA N., MISRA M. K. (eds.). *Genetic Research and Education: Current Trends and the Next Fifty Years*. Indian Society of Genetics and Plant Breeding, New Delhi. pp. 80-86.
- MALLIKARJUNAPPA R. S., DANDIN S. B., VENKATESHAIAH H. V., ANANTHARAMAN M. N., & BONGALE U. D. (2000) Genetic divergence in mulberry. *Indian J. Pl. Genet. Resources*, 13: 130-133.
- MURTY B. R. & ARUNACHALAM V. (1966) The nature of genetic divergence in relation to breeding system in crop plants. *Indian J. Genet. Pl. Breeding*, 26: 188-198.
- RAHMAN M. S., BARI M. A., JOARDER O. I. (2005) Genetic divergence in some mulberry genotypes. *Sericologia*, 45: 163-168.
- RAO C. R. (1952) *Advanced Statistical Methods in Biometrical Research*, John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 357 -363.

- SHARMA B. D. & HORE D. K. (1997) Genetic divergence in Himalayan rice. *Indian J. Pl. Genet. Resources*, 39: 47-58.
- SHARMA J. R. (1988) *Statistical and Biometrical Techniques in Plant Breeding*, New age international (P) Ltd. Publications, New Delhi, pp. 53-68.
- SINGH P. & SINGH V. P., (2002) Genetic divergence in sugarcane germplasm. *Indian J. Agric. Sci.*, 72: 252-253.
- SINGH R. K. & CHOUDHARY B. D. (1995) Variance and covariance analysis. (IN): *Biometrical Methods in Quantitative Analysis*, Kalyani Publishers, New Delhi, pp. 39-69.
- TIKADER A., THANGAVELU K. & RAO A. A. (2004) Characterisation and evaluation of mulberry (*Morus* spp.) germplasm. *Indian J. Seric.*, 43: 106-110.

ANALYSE DE LA DIVERGENCE GENETIQUE CHEZ LE MURIER

H. V. VENKATESHAIAH, R. S. MALLIKARJUNAPPA, M. S. ESWAR RAO,
U. D. BONGALE & M. N. ANANTHARAMAN

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

On a évalué soixante et un génotypes de mûrier (25 indigènes et 36 exotiques) et on a soumis les données regroupées de 9 essais sur trois ans (1999-2002) pour 10 caractères, à l'analyse de la divergence génétique. Les coefficients d'hérédité indiquent que les caractères comme le poids frais de 100 feuilles, le rendement foliaire / plant et la germination et le racinement des boutures sont fortement héréditaires (> 95 %). On classe les 61 génotypes en 6 groupes, ce qui indique l'existence d'une diversité considérable. Le nombre maximum de génotypes se trouve dans le groupe I, suivi par le groupe II (21), le groupe III (6) et le groupe IV (2), tandis que les groupes V et VI n'ont qu'un génotype. Le schéma de regroupement indique que 3 groupes sont hétérogènes par rapport à l'origine géographique des génotypes. Les variables telles que le racinement, le rendement foliaire et le poids frais de 100 feuilles, le bourgeonnement et le nombre de branches / plant sont les caractères qui contribuent le plus à la divergence génétique totale. Les valeurs intra-groupe D^2 varient de 0 à 6,063 et les valeurs inter-groupe D^2 varient de 7,066 à 13,910. Les groupes III et V et V et VI sont très divergents. Les génotypes des variétés 273, 281, 270, 331 et 313 du groupe III, la variété 308 du groupe V et la variété 280 du groupe VI s'avèrent les plus prometteurs, et pourraient donc être utilisés dans des programmes d'hybridation pour l'amélioration du mûrier.

INTRODUCTION

La feuille de mûrier (*Morus* L., Moraceae Link) est la source exclusive de nourriture des vers à soie (*Bombyx mori* L.). Les génotypes de mûrier étant des plantes pérennes à feuillage, à racines profondes, poussant vite et à biomasse élevée, ils présentent une variabilité génétique et une adaptabilité agroclimatique importantes. Comme la culture du mûrier s'étend à des zones géographiques différentes dans le pays, la demande en cultivars de mûrier supérieurs et spécifiques à un lieu, est en hausse constante. Pour répondre à cette demande, on a besoin de programmes de lignage à grande échelle, à long terme. Pour n'importe quel programme de lignage, le germoplasme devient le réservoir le plus précieux pour apporter une variabilité pour des caractères variés (Singh et Singh, 2002). Pour choisir des parents dans des programmes d'hybridation, on a beaucoup utilisé l'analyse de la divergence d'après les statistiques D^2 de Mahalanobis, pour quantifier le degré de divergence génétique parmi les parents chez de nombreuses cultures (Bartual et coll., 1985). Des informations sont disponibles sur la divergence génétique et sur son utilisation dans le lignage du mûrier (Tikader et coll., 2004 ; Rahman et coll. ; 2005). Nous avons réalisé cette étude pour évaluer la part de la diversité génétique chez un lot de 61 génotypes de mûrier, afin d'identifier les parents adaptés à des programmes d'amélioration du mûrier.

MATERIELS ET METHODES

On s'est procuré les 61 génotypes de mûrier (25 indigènes et 36 exotiques) utilisés dans cette étude grâce à des collections de terrain et à des échanges de matériels génétiques entre institutions scientifiques.

On maintient ces génotypes dans la banque génétique de terrain, sur le campus principal de l'Institut (Mallikarjunappa et coll., 1995). On enregistre les données sur les caractères pour la multiplication comme le bourgeonnement et le racinement des boutures, les caractères de croissance et de rendement comme la hauteur du plant, le nombre de branches / plant, la longueur de l'entrenoeud, le poids frais de 100 feuilles, le ratio limbe-pétiole et le rendement foliaire / plant / récolte et les caractères qualitatifs comme la teneur en eau de la feuille et la rétention de l'eau de la feuille six heures après la récolte. On regroupe la performance moyenne des génotypes individuels sur 9 essais pendant 3 ans (1999 – 2002) et on les utilise pour l'analyse statistique.

On procède à l'analyse de variance pour tous les caractères (Singh et Choudhary, 1995 ; Sharma, 1988). On calcule la contribution de chacun des caractères envers la divergence, d'après les classements qu'on leur attribue. On calcule les classements en utilisant le ratio $d_i = Y_i^j - Y_i^k$ où Y_i est la valeur obtenue pour un caractère et les exposants j et k sont les génotypes. En utilisant ces classements, on calcule les pourcentages pour comprendre la contribution de chaque caractère individuel. On procède à l'estimation ultérieure de l'héritabilité (h^2) au sens large et de l'avance génétique (%), qui sont les paramètres de sélection importants qui aident à prédire le gain de la

sélection. On calcule l'héritabilité h^2 en utilisant le ratio $\frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_p}$ où σ^2_p est la variance phénotypique

et σ^2_g est la variance génotypique d'un caractère. On calcule l'avance génétique en utilisant la relation $(\frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_p} \times K) \times 100$, où K est le différentiel de sélection standardisé (valeurs classifiées à une

intensité de sélection spécifique). On calcule aussi l'avance génétique en tant que pourcentage de la moyenne pour connaître l'importance de la sélection d'un caractère spécifique, qui est calculé en utilisant la relation $\frac{\text{avance génétique}}{\text{moyenne}} \times 100$ (Singh et Choudhary, 1955 ; Sharma, 1988). On procède

à l'analyse de la divergence en utilisant les statistiques D^2 de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936). On classe les génotypes dans différents groupes en suivant la méthode de Tocher d'après la description de Rao (1952).

RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse de variance montre des différences très significatives entre les génotypes et les saisons pour les 10 caractères considérés, ce qui indique l'existence d'une variabilité génétique entre les génotypes étudiés. Les coefficients d'héritabilité indiquent que les caractères, tels que le bourgeonnement et le racinement des boutures, le poids frais de 100 feuilles et le rendement foliaire / plant sont très héréditaires (> 95 %) et le nombre de branches / plant, la longueur de l'entrenoeud, la hauteur du plant et le ratio limbe – pétiole en poids ont une héritabilité modérée de 89 à 94 % (Tableau I).

D'après l'amplitude relative des valeurs D^2 , on sépare les 61 génotypes en 6 groupes (Tableau II). Le nombre maximum de génotypes (30) se situe dans le groupe I, suivi par le groupe II, le groupe III et le groupe IV avec respectivement 21,6 et 2 génotypes. Les groupes V et VI contiennent un seul génotype. Le schéma de regroupement indique que 3 groupes sont hétérogènes par rapport à l'origine des génotypes. Mallikarjunappa et coll. (2000), ont fait des observations similaires. On a indiqué que les génotypes de différentes régions géographiques ne donnent pas nécessairement de bons

recombinants et il faudrait donc évaluer les génotypes sur la base de leurs mérites individuels et de la diversité génétique (Joshi et Rana, 1997). Selon Murty et Arunachalam (1966), l'orientation et la sélection génétiques dans différents environnements pourraient entraîner une plus grande diversité que la distance géographique. Le regroupement des génotypes provenant de différentes zones éco-géographiques dans un groupe pourrait venir de l'échange libre possible de matériels ou même de variétés de lignage d'un endroit à l'autre (Sharma et Hore, 1997).

Les valeurs intra-groupe D^2 sont comprises entre 0 à 6,063 (Tableau III). On enregistre les valeurs intra-groupe D^2 les plus élevées dans le groupe III (6,063), suivi par le groupe I (5,022). Les valeurs inter-groupe D^2 sont comprises entre 7,066 et 13,910 (Tableau III). On observe les valeurs inter-groupe D^2 les plus élevées entre les groupes V et VI (13,910) et les groupes III et V (13,837), ce qui indique que les génotypes compris dans ces groupes ont la divergence maximum. On enregistre les valeurs inter-groupe D^2 les moins importantes entre les groupes I et II (7,066). On suggère donc qu'on peut sélectionner les génotypes présentant la distance maximum dans les différents groupes pour les programmes d'hybridation (Singh et Singh, 2002 ; Rahman et coll., 2005).

On calcule la contribution relative des différents caractères envers la divergence génétique totale en utilisant la divergence D^2 de Mahalanobis (Tableau I). Le caractère de racinement présente la plus grande contribution (39,78 %), suivi par le rendement foliaire (16,34 %), le poids frais de 100 feuilles (15,19 %), le bourgeonnement (13,28 %) et le nombre de branches / plant (8,35 %). La contribution la plus faible est celle du ratio limbe-pétiole en poids (2,13 %), suivi par la longueur de l'entrenœud (1,86 %), la hauteur du plant (1,80 %), la rétention de l'eau de la feuille 6 heures après la récolte (0,82 %) et la teneur en eau de la feuille (0,40 %). On pourrait donc donner plus d'importance aux variables les plus contributrices, telles que le racinement, le rendement foliaire, le poids frais de 100 feuilles, le bourgeonnement et le nombre de branches / plant, dans la sélection des parents potentiels dans les programmes d'hybridation (Mallikarjunappa et coll., 2002).

On observe une variation considérable des valeurs moyennes des groupes pour les 10 caractères (Tableau IV). Le groupe III contient les valeurs les plus élevées pour les caractères du poids frais de 100 feuilles, de teneur en eau de la feuille et de rétention de l'eau de la feuille et le génotype prometteur dans ce groupe est la variété 281. Le groupe V détient les valeurs les plus élevées pour les caractères de bourgeonnement et de racinement et le génotype prometteur identifié dans ce groupe est la variété 308. Ces deux groupes présentent aussi une divergence génétique très élevée (13,83). On pourrait donc les prendre en compte pour l'hybridation, de manière à obtenir un bon rendement foliaire avec un bourgeonnement, un racinement, un nombre de feuilles et une distance internodale et une rétention de l'eau de la feuille élevés. La distance inter-groupe entre les groupes V et VI est la plus élevée (13,91). Les génotypes qui rentrent dans ces deux groupes sont respectivement les variétés 308 et 280. La variété 308 est bonne pour la hauteur de plant (182,94 cm), le nombre de branches / plant, le bourgeonnement et le racinement et la variété 208 est bonne pour la longueur de l'entrenœud, le poids frais de 100 feuilles et la rétention de l'eau de la feuille. Ces deux génotypes forment donc une bonne paire pour 7 caractères sur les 10 étudiés. Le rendement foliaire est un caractère dépendant, principalement lié au poids frais de 100 feuilles et à la teneur en eau de la feuille. Les variétés 281, 331 et 273 du groupe III sont exceptionnellement bonnes par rapport à ces deux caractères. Ces génotypes contribueront donc à des rendements foliaires élevés et pourraient donc être pris en compte dans un programme d'amélioration. On peut conclure que les variétés 273, 281, 331 et 308 pourraient être utilisées dans des programmes d'hybridation pour des rendements foliaires plus élevés, la variété 308 pour la hauteur du plant, le nombre de branches / plant, le bourgeonnement / racinement et la variété 280 pour la longueur de l'entrenœud, le poids frais de 100 feuilles et la rétention de l'eau de la feuille.

IN-VITRO FLOWERING AND FRUITING IN THE CULTURES OF *MORUS INDICA* Var. MYSORE LOCAL

D.H. TEJAVATHI, M.P. SHREE*, B. PUSHPAVATHI & SAVITHA M. MURTHY

Department of Botany, Jnanabharathi, Bangalore University, Bangalore 560 056, India

In vitro flowering was observed in the nodal cultures of *Morus indica* var. Mysore Local while studying the effect of growth regulators on multiple shoot regeneration. This interesting phenomenon was noticed when the nodal segments were inoculated on Murashige and Skoog's medium supplemented with either auxin / cytokinin or combinations. However, the best medium in terms of induction of number of catkins was found to be cytokinin supplemented Murashige and Skoog medium. The induced inflorescences developed into fruits in the cultures. The ripening process simulates the *in vivo* development in sequential colour changes from green to white to pink and finally dark violet as in nature. The role of hormone on induction of flowering and possible utility of this phenomenon is discussed.

Keywords : *In vitro* flowering / fruiting, commercial exploitation.

Abbreviations :	As	Adenine sulphate,
	BAP	6-benzylaminopurine,
	2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid,
	2-ip	2-isopentanyl adenine,
	IAA	Indole acetic acid,
	IBA	Indole butyric acid,
	Kin	Kinetin,
	MS	Murashige and Skoog,
	NAA	Naphthalene acetic acid,
	Z	Zeatin.

INTRODUCTION

Morus indica var. Mysore local commonly known as "Natikaddi" was extensively cultivated in traditional sericultural tracts of Karnataka. Though it is comparatively a low yielding variety, known for its adaptability to low agronomic inputs and poor management practices both under rainfed and irrigated conditions. Mulberry is a multipurpose tree, belonging to the family Moraceae. Though mulberry foliage constitutes the chief food for silkworm, extracts from flowers, fruits, bark and also leaves are of great medicinal use.

Before the selection and release of Kanva-2, Mysore local was the most popular indigenous variety in Karnataka. While studying the *in vitro* cultures of this variety with an aim to improve quality and quantity of leaf produced per unit area, *in vitro* flowering leading to fruiting was observed in the nodal culture. In the earlier studies (Mhatre *et al.*, 1985; Tiwary and Subbarao, 1990; Mathew, 2002) *in vitro* flowering was observed from the cultures of shoot tips of *Morus alba*. However, Patel *et al.* (1983) reported development of both male and female inflorescences from some of the axillary bud cultures of *Morus indica*. Though Mysore local was a popular variety in Karnataka before the release

* Department of Sericulture, Jnanabharathi, Bangalore University, Bangalore 560 056, India.

of high yielding varieties and known for its adaptability to low agronomic inputs compared to other varieties not much studies were made to improve the yield.

MATERIALS AND METHODS

Nodal explants from the healthy plants of Mysore local were collected from the sericulture field gene bank in Jnanabharathi campus, Bangalore University, Bangalore. The nodal segments of 1cm length were washed in running water for 10-15 mins. by using Tween-20. Then the explants were washed sequentially with Bovistin solution (antifungal) for 10-12 minutes, mercuric chloride for 4 mins and finally with freshly prepared chlorine water for 10 min. inside the inoculation chamber. Each treatment was followed by thorough washing with sterile distilled water for 3-5 times. Then the explants trimmed at both the ends and were inoculated onto a Murashige and Skoog' medium (1962) supplemented with various growth regulators. The pH of the medium was maintained at 5.6 and sucrose (3%) as carbohydrate source and bacteriological agar (0.9%) as gelling agent were used in the preparation of the media. The cultures were incubated under 16:8 light and dark regime at the constant temperature of $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ and illumination of 2500 lux using white fluorescent lamps.

Different developmental stages of inflorescences were fixed in FAA (Formaldehyde : Acetic acid : Alcohol) for 24 hrs and then transferred to 70% alcohol. Customary paraffin technique was followed. Sections were cut at 15 μm thick and stained in Haidenhains' Haematoxylin and counterstained in Orange-G.

RESULTS

In vitro flowering was observed in nodal cultures while studying the effect of hormones when the explants were collected during flowering season (Table 1). The flowering season of the Mysore local is between February to June.

1. Effect of Auxins:

When the medium was supplemented with different auxins like IAA / IBA / NAA (1-5 mg/l) about 10% of the cultures showed *in vitro* flowering after 3-4 weeks of inoculation. However, on MS+2,4-D (1-5 mg/l) the explant started callusing after two weeks of culture. Presence of IBA/ IAA in the medium induced rooting at the basal region of the explant along with catkins at each node of the proliferated shoot. However, catkins were small and contained a few flowers. Profuse callusing was observed at the basal region of the explant on MS supplemented with NAA. Axillary bud grows into a single shoot but stunted in growth. Catkins were formed at each node of the shoot but they contained only a few flowers (Fig. 1).

2. Effect of Cytokinins:

MS medium with cytokinins (BAP, Kin and Zeatin) promoted formation of female catkins at the nodal regions of the proliferated axillary shoots. Kin (1-3 mg/l) induced the proliferation of the axillary bud after two weeks of culture. When the shoots become 6 cm tall with about 5 to 6 nodes per shoot, female inflorescence started emerging from the 2nd, 3rd and 4th node from the tip of the shoot (Fig. 4). Subsequently, the basal parts of the shoots started callusing. When MS was supplemented with BAP, the number of multiple shoots increases as the concentration increased from 1 to 5 mg/l (Figs. 2, 5, 6). At 1 mg/l, formation of 2-3 shoots per explant was observed, but shoots were stunted with only 1-3 nodes per shoot. One or two catkins were formed at the basal node of each shoot. As the concentration increased, the number of shoots were also doubled. The shoots remained stunted at all the concentrations of BAP. At 3-5 mg/l of BAP, 3-5 catkins per node were seen emerging from the basal nodes of the shoots. These inflorescences were healthy, large in size and development of the fruits was normal. Whereas presence of zeatin in the medium promoted the growth of the axillary bud

into a single shoot with basal callusing (Fig. 3). Roots were started differentiating from the basal callus after 4 weeks of culture. Single inflorescences were initiated at each node when the shoot became 6-8 cm long with 6-7 nodes.

3. Effect of Auxins and Cytokinins:

Media supplemented with auxins along with cytokinins also induced the formation of inflorescences at the nodal region of proliferated shoots. On MS + IBA (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) + AS (1 mg/l) axillary bud grows into a single shoot after two weeks of culture. When these shoots reached 4-5 cms long, female catkins either single or in pairs were initiated at 4th / 5th / 6th nodes from the apex. While on MS + NAA (1 mg/l) + Kin (0.5 mg/l), one or two female catkins were formed at 2nd or 3rd node from the tip. On all these combinations, basal part of the shoots started callusing simultaneously with the formation of roots. The roots were thick and luxuriant in their growth.

Table I. Effect of growth hormones on *in vitro* flowering from nodal cultures of *Morus indica* var. Mysore local.

Tableau I. Effet des hormones de croissance sur la floraison in vitro à partir de cultures nodales de la variété Mysore local de Morus indica.

Sl. No.	Media + Growth Hormones (mg/l)	C	R%	Mean ± S.E.
No. de série	Milieux + Hormones de croissance (mg / l)			Moyenne ± Ecart type
1.	MS + IAA (1)	30	12.20%	4± 0.45
2.	MS + IAA (2)	30	11.10%	3± 0.45
3.	MS + IAA (3)	30	11.60%	4± 0.65
4.	MS + IBA (1)	30	10.0%	4± 0.64
5.	MS + IBA (2)	30	8.86%	3±0.40
6.	MS + NAA (1)	30	11.0%	3±0.97
7.	MS + NAA (2)	30	8.77%	3 ± 0.56
8.	MS + Zea (0.1)	30	60.0%	18± 0.78
9.	MS + Zea (0.3)	30	63.0%	19± 0.84
10.	MS + Zea (0.5)	30	67.0%	20± 0.46
11.	MS + BAP (2)	30	50.0%	15± 0.64
12.	MS + BAP (3)	30	53.0%	16 ± 0.77
13.	MS + BAP (4)	30	70.0%	21± .67
14.	MS + Kin (2)	30	47.0%	14± 0.63
15.	MS + Kin (3)	30	47.0%	14± 0.63
16.	MMS + BAP (2)	30	60.0%	18± 0.70
17.	MS + NAA (0.1) + BAP (5)	30	30.0%	9± 0.71
18.	MS+NAA (0.1) + Kin (4)	30	20.0%	6± 0.53
19.	MS + 2-ip (3) + AS (2)	30	20.0%	6±0.66
20.	MS + IBA (1) + BAP (1) + AS (1)	30	30.0%	9± 0.73

C = Total no. of cultures. / *Nbre total de cultures.*

R% = Percent Response. / *Pourcentage de réponse.*

SE = Standard error. / *Ecart type.*

**SEQUENTIAL COLOUR CHANGES DURING THE MATURATION OF FRUITS.
CHANGEMENTS CONSÉCUTIFS DE COULEUR PENDANT LA MATURATION DES
FRUITS.**

Fig. 1. Nodal culture on MS + NAA (1 mg/l) young inflorescences at each node of the shoot.

Fig. 1. Culture nodale sur MS + NAA (1 mg / l) avec de jeunes inflorescences à chaque noeud de la pousse.

Fig. 2. Milky white young fruits on MS + BAP (1 mg/l).

Fig. 2. Jeunes fruits d'un blanc laiteux sur MS + BAP (1 mg / l).

Fig. 3. White and pinkish fruits on MS + Zeatin (0.1 mg/l).

Fig. 3. Fruits blancs et rosés sur MS + Zéatine (0,1 mg / l).

Fig. 4. Pinkish fruits on MS + Kin (3 mg/l).

Fig. 4. Fruits rosés sur MS + Kin (3 mg / l).

Fig. 5. Light purple fruits on MS + BAP (2 mg/l).

Fig. 5. Fruits violet clair sur MS + BAP (2 mg / l).

Fig. 6. Mature dark purple fruits on MS + BAP (4 mg/l).

Fig. 6. Fruits mûrs violet foncé sur MS + BAP (4 mg / l).



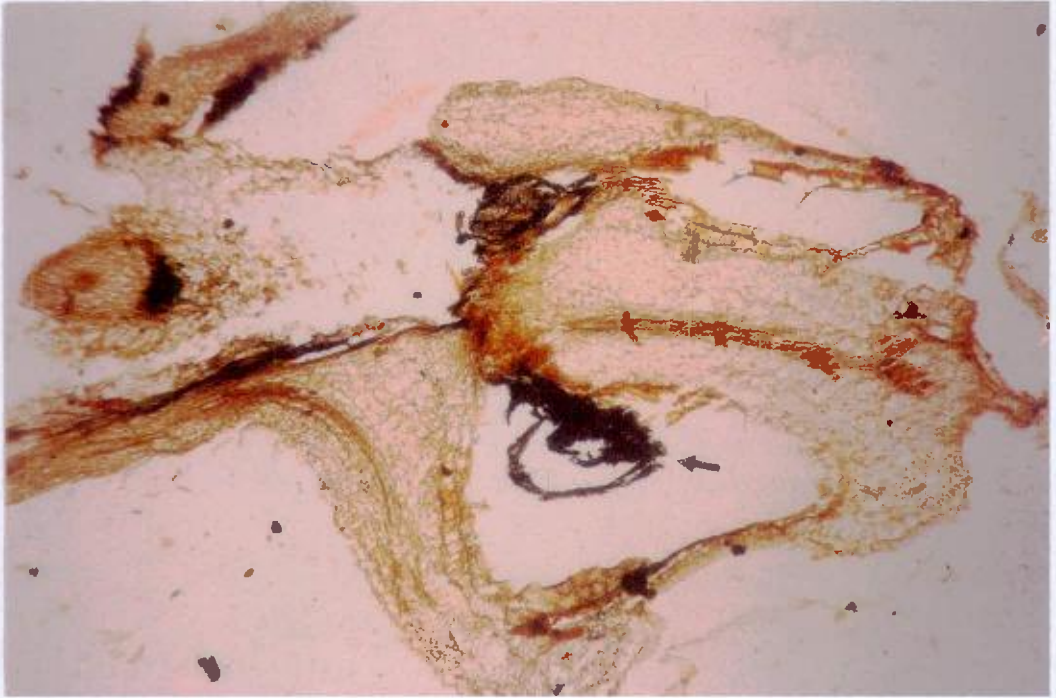


Fig. 7. L. S. of ovary showing degenerated ovule (parthenocarpy).

Fig. 7. Coupe longitudinale de l'ovaire présentant un ovule dégénéré (parthénocarpie)

All the female catkins that were initiated as mentioned above on MS medium supplemented with various growth regulators developed into parthenocarpic fruits (Fig. 7) Sections of flowers and fruits confirm the parthenocarpic development of the fruits. The sequential colour changes from green to milky white to pink to dark red and then finally to dark purple colour simulating the changes in the process of ripening of the fruits in nature was observed (Plate 1).

DISCUSSION

In vitro flowering was observed only when the nodes were collected from the plants during the flowering season. The initiation of flower is a consequence of response of the plant to the appropriate environmental condition. Though the nature of signals responsible for invitation of flowering are yet to be determined, Bernier *et al.* (2003) based on their physiological studies in *Sinapsis alba* and genetic studies in *Arabidopsis thaliana* concluded that a number of different molecules can control the transition to flowering, including carbohydrates, auxins, gibberellins, cytokinins and calcium. Coleman and Nickell (1964) are of the opinion that once floral stimulus is formed, it remains stable even in the isolated shoots. Zeevart (1983) is also of the same opinion that once an apex is committed to flowering, contact with the rest of the plant is no longer necessary for floral differentiation to

proceed to completion. The present studies conform to these reports as the *in vitro* flowering was noticed in the cultures only if explants were excised during flowering season.

In the previous studies (Mathew, 2002, Mhatre et al., 1985, Tiwary and Subbarao, 1990) *in vitro* flowering in *Morus alba* was obtained from the cultures of shoot tips. They failed to induce the axillary flower buds. However, in the present studies, axillary flower initiation is of common occurrence in all the cultures. Patel *et al.* (1983) have reported the development of male and female inflorescences in some axillary bud cultures raised on MS + IBA (1 mg/l) + Kin (1 mg/l). In the present studies, the female catkins developed into mature fruits within 21-28 days. They undergo the maturity process as *in vivo* by changing the colour of the catkins from green to milky white to pink and finally to dark violet / purple. As in nature, these fruits are parthenocarpic.

Histological studies confirms the absence of embryos in the seeds. However, Mathew (2002) had reported withering of flowers without developing into fruits. Sequential colour changes during maturation period and histological studies are reported for the first time in *Morus indica* var. Mysore local.

Auxins have frequently been reported to have inhibited the formation of flowering buds *in vitro* in both long day and short day plants (Nitsch and Nitsch, 1967). Application of α -naphthalene acetic acid enhanced flowering in *in vitro* seedlings of *Pharbitis* and promoted flower bud formation in *Perilla* (Taji and Prakash, 2002). Mathew (2002) had observed *in vitro* flowering in shoot apices of cultured *Morus alba* on only IAA and BAP combinations. Patel *et al.* (1983) have reported flowering in the axillary bud cultures of *Morus indica* on MS + IBA (1 mg/l) + Kin (1 mg/l). Whereas in the present study, *in vitro* flowering was observed on MS supplemented with only auxins / cytokinins and also on combinations. However, cytokinin supplemented medium induced robust, stout and more catkins than the combinations. MS supplemented with either BAP (1-5 mg/l) / Zea (0.1-0.5 mg/l) was found to be best for the production of healthy female inflorescences in more number. Flower induction and development in response to cytokinins have been observed in a few herbaceous plants (Maheswari and Venkataraman, 1966, Nitsch, 1968, Srinivasan and Mulins, 1978). According to Chailakhyan and Butenko (1959) cytokinin is a common requirement for *in vitro* flowering.

CONCLUSION

In mulberry most of the flowers will not set viable seeds, but produce fruits parthenocarpically. Mulberry fruit is considered as highly nutritive. It is having high source of vitamin C and flavonoids. They are being used to prepare pickles, beverages, jams and also used as a tool to study the mechanism of flowering (Handro, 1983, Simmonds, 1987). Perusal of literature reveals that this is the first report on *in vitro* flowering and fruiting in *Morus indica* var. Mysore local where the fruit development is studied from the inception of catkin to the formation of juicy sorosis.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors thank the Bangalore University for providing financial assistance under Interdisciplinary Project.

REFERENCES

- BERNIER, G., HAVELANGE, A., HOUSSA, C., PETITJEAN, A. & LE JEUNE, P. (2003) Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*, 5 : 1147-1155.
 CHAILAKHYAN, M.K.H. & BUTENKO, R. (1959) The effect of adenine and kinetin on the differentiation of flower buds in *Perilla* stem tips. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 129 : 293-295.
 COLLEMAN, R.E. & NICKELL, G. (1964) Stability of the flowering stimulus in isolated stem tips of sugar cane. *Nature*, 201 : 941-942.

- GEETA K. PATEL, BAPAT, V.A. & RAO, P.S. (1983) *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*. Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. Z. Pflanzen Physiol., 111 : 465-468.
- HANDRO, W. (1993) Effect of some growth regulators on the *in vitro* flowering of *Streptocarpus nobilis*. Plant Cell Rep., 2 : 133-136.
- MAHESWARI, S.C. & VENKATARAMAN, M. (1966) Induction of flowering in a duckweed *Wolffia microscopica* by a new Kinin Zeatin. Planta, 70 : 304.
- MATHEW, D. (2002) Differential *in vitro* flowering response of mulberry shoot tips as influenced by maturity of explants and media composition. Sericologia, 42 : 395-402.
- MHATRE, M., BAPET, V.A. & RAO, P.S. (1985) Regeneration of plants from cultures of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.) Plant Cell Rep., 4 : 78-80.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with plant tissue cultures. Physiol. Plant., 15 : 473-497.
- NITSCH, C. & NITSCH, J.P. (1967) The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. II. The production of reproductive buds. Planta, 72 : 371-384.
- NITSCH, C. (1968) Effect of growth substances on the induction of flowering of a short day plant *in vitro*. 1385-1397. In Biochemistry and Physiology of growth substances. F Weightman and F. Scotterfield (eds.) Runge Press, Canada.
- PATEL, G. K., BAPAT, V.A. & RAO, P.S. (1983) *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*. Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. Z. Pflanzenphysiol., 111: 465-468.
- SIMMONDS, J. (1987) IAA inhibition of *in vitro* flowering of the short day plant *Streptocarpus nobilis*. An effect on the maintenance of induction. J. Plant Physiol., 131 : 191-199.
- SRINIVASAN, C. & MULINS, M. G. (1978) Control of flowering in the grape wine (*Vitis unifera* L.) formation of inflorescence by isolated tendrils. Plant Physiol., 61 : 127-130.
- TAJI, A., & PRAKASH, P. (2002) *In vitro* plant breeding. CBS Publishers and Distributors, New Delhi.
- TIWARI, R.K. & SUBBA RAO, G. (1990) Multiple shoot formation through shoot apex culture of mulberry. Indian J. For., 13 : 109-111.
- ZEEVAART, J.A.D. (1983) Gibberllins and flowering 333-374. In : The Biochemistry and physiology of Gibberllins. A. Crozier (ed.) Praeger, New York.

FLORAISON ET FRUCTIFICATION *IN VITRO* DE CULTURES DE LA VARIÉTÉ MYSORE LOCALE DE *MORUS INDICA*

D. H. TEJAVATHI, M. P. SHREE*, B. PUSHPAVATHI & SAVITHA M. MURTHY

Department of Botany, Jnanabharathi, Bangalore University, Bangalore 560 056, Inde.

On a observé une floraison *in vitro* de cultures nodales de la var. Mysore Locale de *Morus indica*, lors de l'étude de l'effet de régulateurs de croissance sur la régénération multiple de pousses. On a remarqué ce phénomène intéressant lors de l'inoculation de segments nodaux sur du milieu de Murashige et Skoog, additionné soit avec de l'auxine soit avec de la cytokinine ou avec des combinaisons. Cependant, le meilleur milieu en termes d'induction du nombre de chatons s'avère être du milieu de Murashige et Skoog additionné de cytokinine. Les floraisons induites dans les cultures se développent en fruits. Le processus de maturation simule le développement *in vivo* avec des changements consécutifs de couleur de vert à blanc à rose et finalement à violet foncé comme dans la nature. Nous présentons une discussion sur le rôle de l'hormone dans l'induction de la floraison et sur l'utilité possible de ce phénomène.

INTRODUCTION

La variété Mysore local de *Morus indica* connue couramment sous le nom de « Natikaddi » a été abondamment cultivée dans les zones séricicoles traditionnelles du Karnataka. Bien que ce soit comparativement une variété à faible rendement, elle est connue pour son adaptabilité à de faibles apports et à de mauvaises pratiques de gestion, à la fois dans des conditions sans et avec irrigation. Le mûrier est un arbre à usages multiples, appartenant à la famille des Moraceae. Bien que le feuillage du mûrier constitue la principale nourriture du ver à soie, les extraits de ses fleurs, de ses fruits, de son écorce ainsi que de ses feuilles ont des vertus médicinales importantes.

Avant la sélection et la commercialisation de Kanva-2, Mysore local était la variété indigène la plus populaire au Karnataka. Lors de l'étude de cultures *in vitro* de cette variété, dans le but d'améliorer la qualité et la quantité de feuilles produites par unité de surface, on a observé une floraison *in vitro*, débouchant sur la fructification de la culture nodale. Au cours d'études précédentes (Mhatre et coll., 1985 ; Tiwary et Subbarao, 1990 ; Mathew, 2002), on a observé une floraison *in vitro*, à partir de cultures d'extrémités de pousses de *Morus alba*. Par ailleurs, Patel et coll., (1983) ont signalé le développement d'inflorescences à la fois mâles et femelles chez certaines cultures de bourgeons axillaires de *Morus indica*. Bien que Mysore local ait été une variété populaire dans le Karnataka avant la commercialisation de variétés à rendement élevé et qu'elle soit connue pour son adaptabilité à de faibles apports par comparaison aux autres variétés, il n'y a pas eu beaucoup d'études réalisées pour améliorer son rendement.

MATERIELS ET METHODES

On a recueilli des explants nodaux de plants sains de Mysore local dans la banque génétique séricicole de terrain du campus de Jnanabharathi, de l'Université de Bangalore, à Bangalore. On lave les explants nodaux de 1 cm de longueur sous l'eau du robinet pendant 10 à 15 minutes, en utilisant

* Department of Sericulture, Jnanabharathi, Bangalore University, Bangalore 560 056

du Tween-20. Puis, on lave ensuite les explants dans une solution de Bovistine (antifongique) pendant 10 à 12 minutes, dans du chlorure mercurique pendant 4 minutes et finalement dans de l'eau chlorée venant d'être préparée pendant 10 minutes dans la chambre d'inoculation. On fait suivre chaque traitement par un lavage complet avec de l'eau distillée stérile à 3 à 5 reprises. Puis, on coupe les explants aux deux extrémités et on les inocule sur du milieu de Murashige et Skoog (1962), additionné avec différents régulateurs de croissance. On maintient le pH du milieu à 5,6 et on utilise le saccharose (3 %) comme source d'hydrate de carbone et l'agar bactériologique (0,9 %) comme gélifiant dans la préparation du milieu. On incube les cultures sous un régime de lumière et d'obscurité de 16 : 8, à une température constante de $24 \pm 2^\circ \text{C}$ et avec une illumination de 2500 lux en utilisant des lampes fluorescentes blanches.

On fixe les différents stades de développement des inflorescences dans de la FAA (formaldéhyde : acide acétique : alcool) pendant 24 hrs et on les transfère ensuite dans de l'alcool à 70 %. On suit la technique de paraffine habituelle. On procède à des coupes de $15 \mu\text{m}$ d'épaisseur, on les colore dans de l'hématoxyline d'Haidenhains et on les contre colore dans de l'Orange G.

RESULTATS

Pendant l'étude de l'effet des hormones, on observe une floraison *in vitro* des cultures nodales quand on recueille les explants pendant la saison de floraison (Tableau I). La saison de floraison de Mysore local se situe de février à juin.

1. Effet des auxines :

Quand on complète le milieu avec différentes auxines comme l'IAA / l'IBA / la NAA (1 à 5 mg / l), environ 10 % des cultures présentent une floraison *in vitro*, au bout de 3 à 4 semaines d'inoculation. Cependant, sur du MS + 2,4D (1 à 5 mg / l) l'explant commence à faire des cals au bout de deux semaines de culture. La présence d'IBA / d'IAA dans le milieu induit le racinement dans la zone basale de l'explant avec des chatons à chaque nœud de la pousse ayant proliféré. Cependant, les chatons sont petits et ne contiennent que quelques fleurs. On observe une formation abondante de cals dans la zone basale de l'explant sur du MS complété avec du NAA. Le bourgeon axillaire croît en une pousse unique mais rachitique. Des chatons se forment à chaque nœud mais ils ne contiennent que quelques fleurs (Fig. 1).

2. Effet des cytokinines :

Le milieu MS avec des cytokinines (BAP, Kin et Zéatine) promeut la formation de chatons femelles dans les zones nodales des pousses axillaires qui ont proliféré. La Kin (1 à 3 mg / l) induit la prolifération d'un bourgeon axillaire au bout de deux semaines de culture. Quand les pousses font 6 cm de longueur, avec environ 5 à 6 nœuds par pousse, l'inflorescence femelle commence à émerger aux 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} nœuds, à partir de l'extrémité de la pousse (Fig. 4). Par la suite, les parties basales des pousses commencent à former des cals. Quand on complète le MS avec du BAP, le nombre de pousses multiples augmente, alors que la concentration passe de 1 à 5 mg / l (Figs 2,5, 6). Avec 1 mg / l, on observe la formation de 2 à 3 pousses par explant, mais les pousses sont chétives avec seulement 1 à 3 nœuds par pousse. Un ou deux chatons se forment au niveau du nœud basal de chaque pousse. Alors que la concentration augmente, le nombre de pousses double aussi. Les pousses restent chétives avec toutes les concentrations de BAP. De 3 à 5 mg / l de BAP, on voit émerger 3 à 5 chatons par nœud à partir des nœuds basaux des pousses. Ces inflorescences sont saines, de grande taille et le développement des fruits est normal. Tandis que la présence de zéatine dans le milieu promeut la croissance d'un bourgeon axillaire en une pousse unique avec une formation de cal basal (Fig. 3). Les racines commencent à se différencier à partir du cal basal au bout de 4 semaines de culture. Des inflorescences uniques commencent à chaque nœud quand la pousse fait 6 à 8 cm de long avec 6 à 7 nœuds.

3. Effet des auxines et des cytokinines :

Les milieux complétés avec des auxines et des cytokinines induisent aussi la formation d'inflorescences dans la zone nodale des pousses ayant proliféré. Sur MS + IBA (1 mg /l) + BAP (1 mg /l) + AS (1 MG /l) le bourgeon axillaire se développe en une pousse unique après deux semaines de culture. Quand ces pousses atteignent 4 à 5 cm de long, il se forme des chatons femelles individuellement ou par deux au niveau des 4^{ème} / 5^{ème} / 6^{ème} nœuds à partir de l'extrémité. Tandis que sur MS + NAA (1 mg /l + Kin (0,5 mg /l), il se forme un ou deux chatons femelles à partir du 2^{ème} ou 3^{ème} nœud à partir de l'extrémité. Pour toutes ces combinaisons, la partie basale des pousses commence à former des cals simultanément à la formation de racines. Les racines sont épaisses et leur croissance est luxuriante.

Tous les chatons femelles qui se forment comme on l'a décrit plus haut sur du milieu MS complété avec différents régulateurs de croissance se développent en fruits parthénocarpiques (Fig. 7). Les coupes des fleurs et des fruits confirment le développement parthénocarpique des fruits. On observe des changements consécutifs de couleur de vert à blanc laiteux, à rose à rouge foncé et finalement à violet foncé, qui simulent les changements que l'on observe dans la nature pendant le processus de maturation (Planche 1).

DISCUSSION

On n'observe une floraison *in vitro* que lorsqu'on recueille les nœuds sur les plants pendant la saison de floraison. La formation d'une fleur est la conséquence de la réponse de la plante aux conditions environnementales appropriées. Bien qu'il reste encore à déterminer la nature des signaux responsables de l'invitation à la floraison, Bernier et coll., (2003), d'après leurs études physiologiques chez *Sinapis alba* et leurs études génétiques chez *Arabidopsis thaliana* ont conclu qu'un certain nombre de molécules peut contrôler le passage à la floraison, dont les hydrates de carbone, les auxines, les gibbérellines, les cytokinines et le calcium. Selon Coleman et Nickell (1964), une fois que le stimulus de la floraison apparaît, il reste stable même chez les pousses isolées. Zeevart (1983) estime également qu'une fois qu'une extrémité s'engage dans la floraison, le contact avec le reste de la plante n'est plus nécessaire, pour que la différenciation florale arrive à son terme. Notre étude est en accord avec ces rapports, puisqu'on ne remarque une floraison *in vitro* dans les cultures que si on excise les explants pendant la saison de la floraison.

Dans des études précédentes, (Mathew, 2002 ; Mhatre et coll., 1985 ; Tiwary et Subbarao, 1990) on a obtenu une floraison *in vitro* chez *Morus alba*, à partir de cultures d'extrémités de pousses. Elles n'arrivaient pas à induire des bourgeons axillaires de fleurs. Cependant, dans notre étude, la formation de fleurs axillaires se produit couramment dans toutes les cultures. Patel et coll., (1983) ont signalé le développement d'inflorescences mâles et femelles dans certaines cultures de bourgeons axillaires réalisées sur MS + IBA (1 mg /l) + Kin (1 mg /l). Dans nos études, les chatons femelles se développent en fruits mûrs en 21 à 28 jours. Ils subissent un processus de maturation de la même manière qu'*in vivo* avec le changement de couleur des chatons de vert à blanc laiteux à rose et finalement à violet / pourpre foncé. Comme dans la nature, ces fruits sont parthénocarpiques.

Les études histologiques confirment l'absence d'embryons dans les graines. Cependant, Mathew (2002) a signalé un flétrissement des fleurs sans qu'elles se développent en fruits. C'est la première fois qu'on signale des changements de couleur consécutifs pendant la période de maturation et des études histologiques chez la variété Mysore local de *Morus indica*.

On a fréquemment signalé que les auxines inhibent la formation de bourgeons de floraison *in vitro* à la fois chez les plantes à jour long et à jour court (Nitsch et Nitsch, 1967). L'application d'acide α -naphtalène acétique encourage la floraison *in vitro* chez les jeunes plants de *Pharbitis* et promeut la formation de bourgeons de fleurs chez *Perilla* (Taji et Prakash, 2002). Mathew (2002) a observé une floraison *in vitro* des extrémités de pousses de *Morus alba* cultivées seulement sur des combinaisons d'IAA et de BAP. Patel et coll. (1983) ont rapporté une floraison des cultures de

bourgeons axillaires de *Morus indica* sur MS + IBA (1 mg / l) + Kin (1 mg / l). Tandis que dans cette étude, on observe la floraison *in vitro* sur du MS complété seulement avec des auxines / des cytokinines et aussi avec des combinaisons. Cependant, le milieu complété avec de la cytokinine induit des chatons solides, robustes et plus nombreux qu'avec les combinaisons. Le MS complété avec du BAP (1 à 5 mg / l) / ou du Zea (0,1 à 0,5 mg / l) s'avère le meilleur pour la production d'inflorescences femelles en plus grand nombre. On a observé une induction et un développement de fleurs, en réponse aux cytokinines chez quelques plantes herbacées (Maheswari et Venkataraman, 1966 ; Nitsch, 1968, Srinivasan et Mulins, 1978). Selon Chailakhyan et Butenko (1959), on a souvent besoin de cytokinine pour la floraison *in vitro*.

CONCLUSION

Chez le mûrier, la plupart des fleurs ne donnent pas de graines viables mais produisent des fruits de manière parthénocarpique. On considère le fruit du mûrier comme très nutritif. C'est une source importante de vitamine C et de flavonoïdes. On les utilise pour préparer des condiments, des boissons, des confitures ainsi que comme outil pour étudier le mécanisme de floraison (Handro, 1983, Simmonds, 1987). L'observation de la littérature montre qu'il s'agit du premier rapport sur la floraison et la fructification *in vitro* chez la variété Mysore local de *Morus indica*, où on a étudié le développement du fruit du commencement du chaton jusqu'à la formation de sorose juteuse.

CALLUS INDUCTION AND EFFICIENT REGENERATION THROUGH ORGANOGENESIS FROM FOLIAR EXPLANTS IN DIFFERENT SPECIES OF MULBERRY

B. N. SHUSHEELAMMA, M. K. PRITHVIRAJE URS, C. K. KAMBLE & R. BALAKRISHNA

Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore – 8, India.

Callus induction was studied in different species of mulberry viz., M. multicaulis, M. bombycis, M. latifolia, M. nigra, M. alba and M. indica. The callus induction rate was very high in M. indica in comparison to exotic introductions. Calli of different species were maintained for more than one year. Frequency of Callus initiation was high on Murashige and Skoog's modified medium with 2.0 mg per l, 2,4-D, 100 mg per l, Casein acid hydrolysate and 15 ml per l coconut water. Regeneration through organogenesis was achieved only in M. indica and M. alba.

Keywords: Callus induction, organogenesis regeneration exotic introductions.

INTRODUCTION

The development of cell and tissue culture methods in higher plants has received considerable attention in recent years. Tissue culture technology promises great impact in forest tree improvement (Bajaj, 1986).

In addition to offering a means of studying genetic and physiological aspects of ontogeny in plants, these techniques also provide opportunities for mutant selection. Improvement by conventional methods of breeding is time consuming especially in tree crops mainly due to the highly heterozygous nature and long life cycle of trees. Regeneration from cell and tissue culture could reduce the time for selection and also desirable improvement could be achieved in mulberry within short period. (Susheelamma *et al.*, 1996). In mulberry, the sole food plant for silkworm (*Bombyx mori* L) the leaf quality plays an important role and the leaf quality parameters like protein, leaf moisture, moisture retention of excised leaves and total chlorophyll content are some of the important factors considered in crop improvement programs. Because of the number and complexity of characteristics that must be combined in a new promising mulberry variety, the creation of such a variety is a cumbersome and very lengthy process. Therefore, one of the main objectives of research in mulberry breeding has been to shorten the time taken for the development of new varieties. The use of “*in vitro*” regeneration offers possibilities of reducing the time required to produce new variations. Oka and Ohyama (1981) demonstrated the formation of adventitious buds directly induced without intermediate callus formation in the leaf explants of mulberry. Plantlets were directly obtained from axillary buds (Kim *et al.*, 1985 and Mhatre *et al.*, 1985). Regeneration of plants has been obtained from foliar explants through organogenesis in Apocynaceae tree (*Thevetia peruviana*) (Kumar, 1992). Similar results have also been reported in mulberry (Susheelamma *et al.*, 1996), Kapur *et al.*, (2001) obtained regeneration from mature leaf explants of field grown plant in mulberry. The present study indicates the results of evaluation of callus induction and regeneration capacity in different species of mulberry.

MATERIALS AND METHODS

Five species from gene pool of CSR & TI, Mysore, comprising of exotic introductions *M. multicaulis*, *M. latifolia* and *M. bombycis* which are exotic introductions from Japan, *M. nigra* from India and breeder's stock material (*M. alba* and *M. indica*) from India were selected for the present study on the basis of agronomic characters. *In vitro* regeneration ability of these species was tested using each of the two media combinations (series M1 and M2) described in Table I. Each series consisted of three culture media, viz., a callus induction medium (IM), a shoot bud induction medium (SM) and a regeneration medium (RM).

Table I. Components of callus induction, shoot bud induction and regeneration media used for testing *in-vitro* regeneration ability of different species in mulberry.

Tableau I. Composants des milieux d'induction de cals, d'induction de bourgeons de pousses et de régénération, utilisés pour tester la capacité de régénération in vitro de différentes espèces de mûrier.

Medium		Composition of medium
Milieu		Composition du milieu
	M1	M2
IM1	MS+2mg/l 2.4D 150ml/l coconut water / <i>eau de noix de coco</i> , 100 mg/l casein acid hydrolysate	MS+2mg/l, 2.4D 1mg/l BAP
SM2	MS+2mg/l BAM 1mg/l NAA	MS+1mg/l BAP 50ml/l coconut water / <i>eau de noix de coco</i> 0.5mg/l GA3
RM3	MS+1mg/l BAP 0.5 mg/l NAA	MS+0.5mg/l BAP 1mg/l NAA 0.1mg/l riboflavine 0.2mg/l ascorbic acid / <i>acide ascorbique</i> 100ml/l coconut water / <i>eau de noix de coco</i>

IM1: Callus induction medium / *Milieu d'induction de cal.*

SM2: Shoot bud induction medium / *Milieu d'induction de bourgeons de pousses.*

RM3: Plant regeneration medium / *Milieu de régénération des plants.*

MS: Murashige and Skoog, 1962

2, 4D: 2, 4 – dichlorophenoxy acetic acid / *Acide 2,4 – dichlorophénoxy acétique.*

BAP: 6 Benzyl amino purine

NAA: Alpha naphthalene acetic acid / *Acide alpha naphtalène acétique.*

GA3: Gibberellic acid / *Acide gibbérélique.*

Table II. Frequency of callus initiation from leaf meristem on MS medium with different hormones.**Tableau II. Fréquence d'amorces de cals à partir du méristème de la feuille sur le milieu MS avec différentes hormones.****No. of foliar explants forming callus (50 foliar explants/treatment) / Nbre d'explants foliaires formant le cal (50 explants foliaires / traitement).**

Species	Media					
Espèce	Milieux					
	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6
<i>Morus nigra</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Morus latifolia</i>	9 (18)**	0 (0)	12 (24)	20 (40)	10 (15)	0 (0)
<i>Morus bombycis</i>	12(24)	0 (0)	10 (20)	12 (30)	8 (15)	0 (0)
<i>Morus multicaulis</i>	19(38)	0 (0)	25 (50)	19 (38)	15 (30)	0 (0)
<i>Morus alba</i>	18(36)	0 (0)	25 (50)	35 (70)	8 (16)	0 (0)
<i>Morus indica</i>	20(40)	0 (0)	20 (40)	45 (85)	9 (18)	0 (0)

** : Number in parenthesis is the percentage / Le chiffre entre parenthèses représente le pourcentage.

MS – Murashige and Skoog, 1962.

MS1 – MS+2mg/l IBA, 1mg/l BAP.

MS2 – MS+2mg/l IAA, 1mg/l BAP.

MS3 – MS+2mg/l 2, 4D, 1mg/l BAP.

MS4 – MS +2mg/l 2, 4D, 150ml/l coconut water 100 mg/l casein acid hydrolysate.

MS +2mg/l 2, 4D, 150ml / l eau de noix de coco, 100 mg / l d'hydrolysate acide de caséine.

MS5 – MS+2mg/l IBA, 150ml/l coconut water 100 mg/l casein acid, hydrolysate.

MS+2mg/l IBA, 150ml / l eau de noix de coco, 100 mg / l d'hydrolysate acide de caséine.

MS6 – MS+2mg/l IAA, 150ml/l coconut water, 100 mg/l casein acid.

MS+2mg/l IAA, 150ml / l eau de noix de coco, 100 mg / l d'acide de caséine.

Axillary buds of all six species were surface sterilized and were cultured on basal medium consisting of macro and micro nutrients of Murashige and Skoog (1962) and Vitamin Composition of Linsmaier and Skoog (1965) fortified with 2 mg /l BAP and 30 mg/ l activated Charcoal and solidified with 0.8% agar. A minimum of fifty cultures per species were initiated to obtain shoots with good number of leaves after about 15 days of incubation. Young leaves from these *in vitro* raised shoots were cut into small pieces and inoculated onto the callus induction medium (Table I). Different hormones were used for callus induction to see their effect on callus induction before optimizing the media (Table II). Calli obtained from different genotypes were sub cultured at intervals of fifteen days. After 3 months of sub-culturing, the calli were cultured on shoot bud induction medium (Table I). Later the freshly induced shoot buds were cultured on regeneration medium RM3- MS2 (Table II). The cultures at all stages were maintained under a uniform culture condition of 16 h light/ 8 h dark photoperiod, a light intensity of 2000 lux and temperature of $26 \pm 2^\circ \text{C}$.

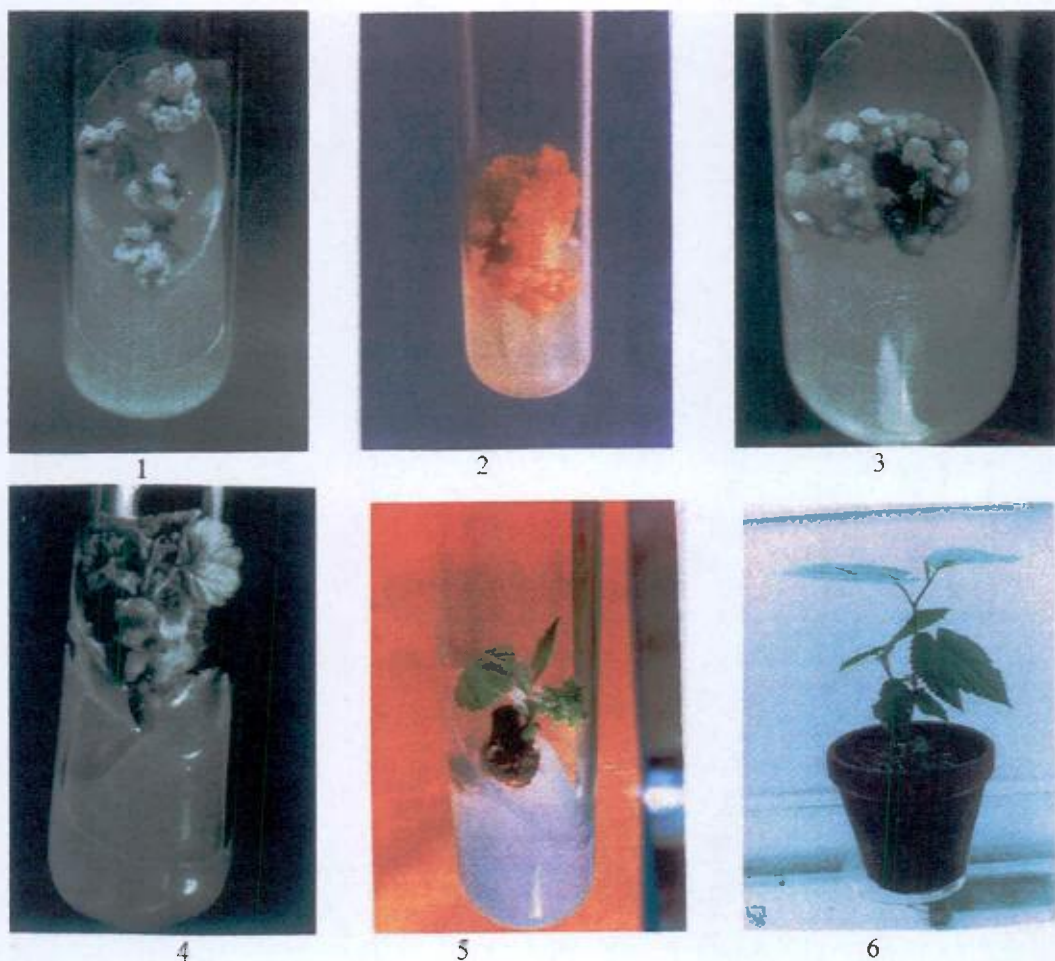


Fig. 1. Callus proliferation from cut margins of leaf explants of *in vitro* raised plant.

Fig. 1. Prolifération de cal à partir des bordures coupées des explants de feuilles chez un plant cultivé *in vitro*.

Fig. 2. Foliar explant turned into compact callus in *Morus indica*.

Fig. 2. Explant foliaire de *Morus indica* s'étant transformé en cal compact.

Fig. 3. Differentiation of multiple shoot buds from the callus.

Fig. 3. Différenciation de bourgeons de pousses multiples à partir du cal.

Fig. 4. Shoot development from the differentiated shoot buds.

Fig. 4. Développement de pousses à partir de bourgeons de pousses différenciés.

Fig. 5. Regenerated plantlet. / Fig. 5. Plant régénéré.

Fig. 6. Establishment of plantlet in the pot. / Fig. 6. Etablissement du plant en pot.

Table III. Percentage of callus proliferation, frequency of shoot initiation and number of plants regenerated in six species of mulberry.

Tableau III. Pourcentage de prolifération de cals, de fréquence d'amorces de pousses et nombre de plants régénérés chez six espèces de mûrier.

Name of the species	No. of explants inoculated	Percentage of callus proliferation from culture	Age of callus (days)	No. of calli cultured	Percentage of calli showing shoot initiation	Type of callus	No. of plantlets regenerated per callus
Nom de l'espèce	Nbre d'explants inoculés	Pourcentage de prolifération de cals à partir de la culture	Age du cal (jours)	Nbre de cals cultivés	Pourcentage de cals présentant un début de pousses	Type de cals	Nbre de plants régénérés par cal
<i>M. nigra</i>	50	-	-	-	-	-	-
<i>M. latifolia</i>	50	40 ± 2	90	40	15	B	-
<i>M. bombycis</i>	50	30 ± 1	90	40	10	C	-
<i>M. multicaulis</i>	50	50 ± 1	90	40	20	A	-
<i>M. alba</i>	50	70 ± 1	90	40	35	A	8-10
<i>M. indica</i>	50	85 ± 1	90	40	60	A	15-20

Regenerated plantlets were hardened in pots containing vermi culture and same for 30 days. The pots were shifted to field and observed for morphological variations. Data on important quantitative and qualitative characters contributing to foliage productivity of the regenerated plantlets revealed morphological variations.

RESULTS AND DISCUSSION

Foliar explants cultured on Murashige and Skoog modified medium supplemented with 2mg / l casein acid hydrolysate callused profusely from the cut margins of *M. indica* (Figure 1). Three types of calli were observed viz.; (A) Soft watery translucent green calli were observed in only *M. alba* and *M. indica* sp. (B) Slightly nodular well growing callus observed in *M. multicaulis*, *M. bombycis* and (C) rapidly growing compact callus observed in *M. latifolia* (Table III). Among the various hormonal combinations tested for callus induction, MS4 medium induced high percentage of calli (Table II). However, callus was not induced in *M. nigra* species and frequency of callus initiation was very low in *M. latifolia* and *M. bombycis*.

In *M. indica*, percentage of callus induction was very high (Table III). Callus quality varied considerably among species. Calli sub cultured on SM2 produced shoot bud (Figure 3). Shoot buds regenerated into plantlets (Figure 4, 5 and 6) when sub-cultured on regeneration medium through organogenesis. This observation is on confirmation with the findings of Mhatre *et al.*, (1985) and Susheelamma, *et al.*, (1996), where they reported shoot bud development from callus derived from the base of cultured leaves of a genotype of *M. indica* and Kumar (1992) in *Apocynaceae* trees, where he obtained regeneration of plantlets from foliar callus. In the present study, for the first time species control over callus induction and regeneration ability of different species has been studied by

including different species from the germplasm. Regeneration ability was not achieved in all the species and the percentage of regeneration varied among the species (Table III) indicating species control. Plants that were regenerated in the present study came from callus cultures that were highly organized. Most of the plantlets were derived from separate pieces of calli. However, in *M. indica* 3 to 4 plantlets were regenerated from a single piece of callus.

The present study revealed, existence of strong species into medium interaction for callus induction from leaf meristems and regeneration ability in six species (*M. multicaulis*, *M. latifolia*, *M. bombycis*, *M. nigra*, *M. alba* and *M. indica*) which were evaluated. Regenerated plants of *M. indica* were evaluated for morphological variations. One of the plantlets regenerated from *M. indica*, callus showed beneficial variations like shorter inter nodal distance (2–90 cm), thicker leaves (150.45 µm), higher chlorophyll content (3.8 mg/g fresh wt.). Higher moisture content (79.50%) and better moisture retention (69.00%) after 12 hours of harvest. Unfortunately, the frequency of regeneration was very low (20%) in *M. indica* also. Therefore, further investigations on identification of the factors which inhibit plant regeneration followed by identification of methods for overcoming this inhibition would improve regeneration of plantlets from callus culture.

REFERENCES

- BAJAJ Y.P.S. (1986) Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. In Y.P.S Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol – I. Trees, pp 1-22. Springer Verlag, Berlin.
- KIM H., PATEL K.R. & THORPE T.A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot-Gaz., 146: 335-340.
- KAPUR A., BHATNAGAR S. & KHURANA P. (2001) Efficient in-vitro regeneration from matured leaf explants of Indian mulberry. Sericologia. 41: 207-214.
- KUMAR A. (1992) Morphogenesis in foliar callus of an apocynaceous tree, *Thevetia peruviana*. Indian. J. Expt. Biol, 30: 749-750.
- LINSMAIER E.M & SKOOG F. (1965) Organic growth factor requirement for tobacco tissue Culture. Physiol. Plant, 18: 100-127.
- MHATRE M. BAPAT V.A. & RAO P.S. (1985) Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L). Plant Cell Rep, 4: 78-80.
- MURASHIGE T. & SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. Physiol. plant, 15 : 473-497
- OKA S. & OHYAMA K. (1981) *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyadamine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). Can. J. Bot, 59 : 68-74.
- SUSHEELAMMA B.N., RAJASHEKAR K., SARKAR A., RAO M.R. & Datta R.K. (1996) Genotype and hormonal effects on Callus formation and regeneration in mulberry. Euphytica, 90 : 25-299.

INDUCTION DE CALS ET REGENERATION EFFICACE PAR L'ORGANOGENESE D'EXPLANTS FOLIAIRES CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE MURIER

B. N. SUSHEELAMMA, M. K. PRITHVIRAJE URS, C. K. KAMBLE & R. BALAKRISHNA

Central Sericultural Research & Training Institute, Srirampura, Mysore -8, Inde.

Nous avons étudié l'induction de cals chez différentes espèces de mûrier, c'est-à-dire, M. multicaulis, M. bombycis, M. latifolia, M. nigra, M. alba et M. indica. Le taux d'induction de cals est très élevé chez M. indica par comparaison aux espèces exotiques. On maintient les cals de différentes espèces pendant plus d'une année. La fréquence d'initiation de cals est élevée sur du milieu de Murashige et Skoog, modifié avec 2 mg de 2,4 D par litre, 100 mg d'hydrolysate acide de caséine par litre et 15 ml par l d'eau de noix de coco. La régénération par l'organogenèse a été obtenue seulement chez M. indica et M. alba.

INTRODUCTION

Depuis quelques temps, on accorde beaucoup d'attention à la mise au point de méthodes de culture des cellules et des tissus chez les plantes supérieures. L'impact de la technologie de culture des tissus est important pour l'amélioration des arbres forestiers (Bajaj, 1986).

Tout en permettant d'étudier les aspects génétique et physiologique de l'ontogénie chez les plantes, ces techniques permettent aussi de sélectionner des mutants. L'amélioration par des méthodes conventionnelles de lignage prend du temps, surtout chez les arbres forestiers, principalement à cause de leur nature hétérozygote et de leur long cycle de vie. La régénération à partir de la culture de cellules et de tissus pourrait diminuer la durée de la sélection et pourrait aussi permettre d'obtenir une amélioration désirable chez le mûrier, en l'espace d'une courte période (Susheelamma et coll., 1996). Chez le mûrier, la seule plante hôte du ver à soie (*Bombyx mori* L.), la qualité de la feuille joue un rôle important et les paramètres de qualité de la feuille comme les protéines, l'eau de la feuille, la rétention de l'eau des feuilles excisées et la teneur totale en chlorophylle sont des facteurs importants, que l'on prend en compte dans les programmes d'amélioration des cultures. En raison du nombre et de la complexité des caractéristiques qui doivent être combinées chez une nouvelle variété de mûrier prometteuse, la création de cette variété est un processus pesant et long. L'un des principaux objectifs de la recherche dans le lignage du mûrier est donc de raccourcir la durée de mise au point des nouvelles variétés. L'utilisation de la régénération « *in vitro* » permet de diminuer la durée nécessaire pour produire de nouvelles variations. Oka et Ohyama (1981) ont obtenu la formation de bourgeons adventifs directement induits, sans formation intermédiaire de cals chez des explants de feuille de mûrier. Des plants ont aussi été obtenus directement à partir de bourgeons axillaires (Kim et coll., 1985 et Mhatre et coll., 1985). On a également obtenu la régénération de plants à partir d'explants foliaires, par organogenèse chez l'arbre Apocynaceae (*Thevetia peruviana*) (Kumar, 1992). On a signalé des résultats similaires chez le mûrier (Susheelamma et coll., 1996) et Kapur et coll., (2001), qui ont obtenu la régénération à partir d'explants de feuilles de plants de mûrier cultivés sur le terrain. Nous présentons les résultats obtenus dans cette étude par rapport à l'induction de cal et par rapport à la capacité de régénération de différentes espèces de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Pour cette étude, nous avons sélectionné six espèces sur la base des caractères agronomiques, appartenant au stock génétique du CSR&TI de Mysore, comprenant les espèces exotiques *M. multicaulis* et *M. bombycis*, qui sont des espèces du Japon, *M. nigra* d'Inde et le matériel souche de lignage (*M. alba* et *M. indica*) d'Inde. On teste la capacité de régénération de ces espèces en utilisant chacune des deux combinaisons de milieux (séries M1 et M2), décrites dans le Tableau I. Chaque série est constituée de trois milieux de culture, c'est-à-dire un milieu d'induction de cals (IM), un milieu d'induction de bourgeons (SM) et un milieu de régénération (RM).

On stérilise la surface des bourgeons axillaires des six espèces et on les cultive sur un milieu de base constitué de macro et de micronutriments de Murashige et Skoog (1962) et de la composition en Vitamines de Linsmaier et Skoog (1965), fortifié avec 2 mg / l de BAP et 30 mg / l de charbon activé et solidifié avec 0,8 % d'agar. On débute un minimum de cinquante cultures par espèce afin d'obtenir des pousses avec un bon nombre de feuilles au bout de 15 jours d'incubation. On coupe les jeunes feuilles de ces pousses cultivées *in vitro* en petits morceaux et on les inocule sur les milieux d'induction de cals (Tableau I). On utilise différentes hormones pour l'induction de cals afin de voir leur effet sur l'induction de cals, avant d'optimiser les milieux (Tableau II). On procède aux sous-cultures des cals des différents génotypes, avec des intervalles de culture de 15 jours. Après 3 mois de sous-culture, on cultive les cals sur un milieu d'induction de pousses (Tableau I). Plus tard, on cultive les bourgeons de pousses qui viennent d'être induits, sur un milieu de régénération RM3-MS2 (Tableau II). On maintient les cultures à tous les stades dans des conditions uniformes avec une photopériode de 16 h de lumière / de 8 h d'obscurité, une intensité de lumière de 2000 lux et une température de $26 \pm 2^\circ \text{C}$.

Les plants régénérés durcissent dans les pots contenant de la vermi-culture pendant une période de 30 jours. On transfère les pots sur le terrain et on observe les variations morphologiques. Les données sur les caractères quantitatifs et qualitatifs importants, contribuant à la productivité du feuillage, des plants régénérés révèlent des variations morphologiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les explants foliaires cultivés sur du milieu modifié de Murashige et Skoog complété avec 2 mg / l d'hydrolysate acide de caséine, donnent des cals abondants à partir des bordures coupées de *M. indica* (Figure 1). On observe trois types de cals c'est-à-dire (A) des cals tendres d'un vert translucide aqueux seulement chez les espèces *M. alba* et *M. indica* (B). On observe un cal légèrement nodulaire poussant bien chez *M. multicaulis*, *M. bombycis* et (C) un cal compact poussant rapidement chez *M. latifolia* (Tableau III). Parmi les différentes combinaisons hormonales testées pour l'induction de cals, le milieu MS4 induit un pourcentage élevé de cals (Tableau II). Cependant, il n'y a pas de cal induit chez l'espèce *M. nigra* et la fréquence de formation de cal est très faible chez *M. latifolia* et *M. bombycis*.

Chez *M. indica*, le pourcentage d'induction de cal est très élevé (Tableau III). La qualité du cal varie considérablement entre les espèces. Les cals sous-cultivés sur SM2 produisent des bourgeons de pousses (Figure 3). Les bourgeons de pousses se régénèrent en plants (Figures 4, 5 et 6), quand on les sous-cultive sur un milieu de régénération. Cette observation confirme les résultats de Mhatre et coll., (1985) et de Susheelamma et coll., (1996), qui ont rapporté un développement de bourgeons de pousses avec des cals obtenus à partir de la base de feuilles cultivées chez un génotype de *M. indica* et de Kumar (1992) chez les arbres *Apocynaceae*, où il a obtenu la régénération de plants à partir de cals foliaires. Dans cette étude, nous avons étudié pour la première fois le contrôle de l'espèce par rapport à l'induction de cal et par rapport à la capacité de régénération. Nous n'avons pas obtenu de régénération chez toutes les espèces et le pourcentage de régénération varie entre les espèces (Tableau III), ce qui indique un contrôle par l'espèce. Les plants qui sont régénérés dans cette étude proviennent de cultures de cal, qui étaient très organisées. La plupart des plants proviennent de

différents morceaux de cals. Cependant, chez *M. indica*, 3 à 4 plants ont été régénérés à partir d'un seul morceau de cal.

Cette étude révèle l'existence d'espèce fortes chez les six espèces qui ont été évaluées (*M. multicaulis*, *M. latifolia*, *M. bombycis*, *M. nigra*, *M. alba* et *M. indica*) par rapport à l'interaction avec le milieu d'induction de cals à partir de méristèmes de feuille, et pour la capacité de régénération. On évalue les variations morphologiques des plants de *M. indica* régénérés. Un des plants régénérés à partir de cals de *M. indica* présente des variations bénéfiques comme une distance internodale plus courte (2 à 90 cm), des feuilles plus épaisses (150,45 µm), une teneur élevée en chlorophylle (3,8 mg / g de poids frais), une teneur plus élevée en eau (79,50 %) et une meilleure rétention de l'eau (69 %) 12 heures après la cueillette. Cependant, la fréquence de régénération est très faible (20 %) chez *M. indica*. Il faudrait donc des recherches supplémentaires sur l'identification des facteurs qui inhibent la régénération des plants, suivies par l'identification de méthodes pour surmonter cette inhibition, cela contribuerait à améliorer la régénération de plants, à partir de cultures de cals.

STUDIES ON WATER REQUIREMENT AND WATER USE EFFICIENCY AT DIFFERENT METHODS AND LEVELS OF IRRIGATION IN MULBERRY

N. SIDDALINGASWAMY¹, U. D. BONGALE¹, A. G. BANDI², S. N. NARAYANGOWDA¹
& R. M. SHIVAPRAKASH¹

1.Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura
Bangalore-560 062,Karnataka State, India.

2.Department of Agronomy, University of Agricultural Sciences, Bangalore - 560 065. Karnataka,
India.

The experiment was conducted with M-5 mulberry variety at Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore for two years (1998-2000). The experimental design was split-split plot with 18 treatment combinations and three replications each. Pooled data of four harvests of two years for non rainy period, among 18 treatment combinations the highest leaf yield was recorded in 60 × 60 cm spacing with drip irrigation at 0.9 Epan with an average water requirement of 1.55 l/ plant/day. The drip irrigated plots recorded maximum water use efficiency at all levels of irrigation in closer spacing. A saving of 33 to 66 per cent of water was recorded in drip and chapin tape methods compared to furrow methods.

Keywords: Cumulative pan evaporation (CPE)/ pan evaporation (Epan), drip irrigation, leaf yield, mulberry, plant spacing, water requirement, water use efficiency.

INTRODUCTION

Water is a vital natural resource available on earth. The demand for water has been consistently rising in the recent past for industry and domestic sectors, which may encroach the water available for agriculture sector also. This in future will reduce the availability of water for agriculture as a result of which, agriculture will have to face the challenge of producing more utilizing less water. Hence, there is the need for enhancing the water use efficiency by adoption of new technologies like micro-irrigation for commercial agriculture crops in general and high value horticulture crop in particular (Krishnamanohar, 1996).

Mulberry is cultivated over a wide range of soils under variable agro-climatic, topographic and cultivation systems together defining local situations. This makes it difficult to precisely calculate water requirements. The total amount of water needed by the mulberry in one hectare over one year is estimated around 109 cm, on the basis of climatology approach studies (Suryanarayana and Kulkarni, 1989).

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted with M-5 mulberry variety at the campus of Karnataka State Sericulture Research and Development Institute (KSSRDI) Bangalore for 2 years (1998-2000). Out of a total of ten harvests taken into consideration during two years (1998-2000), four experimental harvests (two

each for the two years) during the non-rainy periods were observed. The soil was red sandy clay loam with a pH of 7.55 and EC of 0.47 dS/m. The field capacity from 0 to 90 cm was 24.2 % and permanent wilting point was 14.5 % (pressure plate membrane apparatus method) and bulk density was 1.47 g/cc (core sampler method). The experimental design was split-split plot with 18 treatment combinations and three replications each.

The treatment details are as follows.

a) Main treatment (2) : Plant spacings :

S₁ (60 × 60 cm);

S₂ (120 × 60 cm);

b) Sub-treatments (3): Methods of irrigation :

I₁ (Furrow method);

I₂ (Drip method);

I₃ (Chapin tape method);

c) Ultimate treatments (3) : Levels of irrigation :

L₁ (0.3CPE./ Epan);

L₂ (0.6CPE / Epan);

L₃ (0.9CPE./ Epan).

(CPE – for Furrow method, and Epan – for Drip and Chapin tape method)

Irrigation was given based on open pan evaporation reading for non-rainy period crops ie, 1st and 2nd crops for both the years (1998-2000). For drip and chapin tape method, irrigation was given daily at three levels (0.3 Epan, 0.6 Epan and 0.9 Epan) and for furrow method irrigation was given once in seven days at three levels (0.3 CPE, 0.6 CPE and 0.9 CPE) cumulating the Epan values for the previous seven days.

Application of farm yard manure and chemical fertilizers and cultural practices were attended as per the package of practices recommended for mulberry under irrigated conditions (Jolly, 1987; Bongale, 1994). Harvesting was done by pruning, for every harvest by following step up method with a basal height of 30 cm from the ground. Leaf yield was recorded by harvesting all the plants of the micro plot and the yield computed as kg/ha. To assess water requirement of mulberry, quantum of irrigation was calculated as follows (Krishnamanohar *et al.*, 1996).

Quantity of water applied (litres) = Pan evaporation (mm) × Area (sq.m)

Duration of irrigation for Drip and Chapin tape method:

Daily irrigation time (hr.) / unit area =
$$\frac{\text{Quantity of water applied (litres)}}{\text{No. of drippers or outlets} \times \text{Discharge rate (LPH)}}$$

For furrow method:

Weekly irrigation time (hr or min) / unit area =
$$\frac{\text{Quantity of water applied (ha - cm or litres)}}{\text{Discharge rate of pipe / unit time (litres)}}$$

Water requirement (ha-cm/day) = Amount of water applied (ha-cm/day) × No. of irrigation + Effective rainfall (cm)

Water use efficiency (WUE) was worked out for all the four crops (non-rainy periods) by using the formula.

$$WUE = \frac{\text{Economic yield (kg ha}^{-1}\text{)}}{\text{Water use (cm)}}$$

Here the unit of measurement of amount or quantity or volume of water was liter or ha-cm.

Hectare centimeter (ha-cm) is the volume of water required to cover an area of 1 hectare (10,000sq.m.) to a depth of 1cm. (1ha-cm = 100 cubic meters = 100,000 liters)

RESULTS

1. Water requirement:

The data on water requirement (ha-cm or l/day) are presented in Table I.

Water was applied as per the treatment and schedule. The highest water requirement was recorded in second crops of both the years and the lowest in first crop of both the years at all the levels of irrigation. Average values of four crops recorded maximum water requirement at 0.90CPE/Epan (0.43ha-cm/day) followed by 0.60CPE/Epan (0.32ha-cm/day) and at 0.30CPE/Epan (0.22ha-cm/day).

Table I. Water requirement (Liters/plant/day or ha-cm /day) as influenced by levels of irrigation at different plant spacing in mulberry (Average of four non rainy period crops).

Tableau I. Besoin en eau (litres / plant / jour ou ha cm / jour) sous l'influence des niveaux d'irrigation avec différents espacements des plants de mûrier (moyenne de quatre récoltes pendant la saison sèche).

Year	Crops	60 × 60 cm			120 × 60 cm		
Année	Récoltes						
		0.3CPE /Epan	0.6CPE / Epan	0.9CPE /Epan	0.3CPE /Epan	0.6CPE /Epan	0.9CPE /Epan
1998-99	I crop / Récolte I	0.468	0.792	1.152	0.936	1.584	2.304
	II crop / Récolte II	0.864	1.368	1.872	1.728	2.736	3.744
1999-2000	I crop / Récolte I	0.648	1.080	1.512	1.296	2.160	3.024
	II crop / Récolte II	1.152	1.404	1.656	2.304	2.808	3.312
Liters/plant/day (Av.of 4 crops)		0.792	1.152	1.548	1.584	2.304	3.096
Litres / plant / jour (Moy. de 4 récoltes)							
SD		0.255	0.247	0.328	0.510	0.495	0.524
Ha-cm/day / Ha-cm / jour (Av.of 4 crops)		0.22	0.32	0.43	0.22	0.32	0.43
(Moy. de 4 récoltes)							

SD - Standard deviation / Ecart type.

Table II. Water use efficiency (kg/ha-cm) and leaf yield (kg/ha/crop) as influenced by methods and levels of irrigation at different plant spacing in mulberry (Average of four non rainy period crops).

Tableau II. Efficacité d'utilisation de l'eau (kg / ha cm) et rendement foliaire (kg / ha / récolte) sous l'influence des méthodes et des niveaux d'irrigation avec différents espacement des plants chez le mûrier (moyenne de quatre récoltes pendant la saison sèche).

Particulars	Water use efficiency (kg/ha-cm)	Leaf yield (kg/ha/crop)
<i>Caractéristiques</i>	<i>Efficacité d'utilisation de l'eau (kg / ha - cm)</i>	<i>Rendement foliaire (kg / ha / récolte)</i>
Main treatments (Spacing) / Traitements principaux (espacement)		
S1 (60 × 60 cm)	470	10,090
S2 (120 × 60 cm)	409	8,709
F test	*	*
CD at 5%	17.07	563
SD	124 & 105	1436 & 996
Sub treatments (Methods of irrigation)		
<i>Sous-traitement (methodes d'irrigation)</i>		
I1 (Furrow / Sillons)	428	9,133
I2 (Drip / Goutte à goutte)	446	9,564
I3 (Chapin tape / Ruban Chapin)	444	9,501
F test	NS	NS
SD	110, 124 & 125	1020, 1679 & 1443
Sub-sub treatments (Levels of irrigation)		
<i>Sous-sous traitements (Niveaux d'irrigation)</i>		
L1 (0.3 CPE/Epan)	586	8,496
L2 (0.6 CPE/Epan)	406	9,425
L3 (0.9 CPE/Epan)	328	10,278
F test	*	*
CD at 5%	21.66	325
SD	62, 47 & 34	1099, 1280 & 1300
Interactions		
S × I (Main × Sub treatments) - F test	*	*
<i>Test F - S × I (Traitements principaux × sous traitements)</i>		
CD at 5% (I)	37.69	800
(S)	34.36	829
S × L (Main × Sub-sub treatments) F test	NS	NS
<i>Test F - S × L (Traitement principaux × sous-sous traitements)</i>		
I × L (Sub × Sub-sub treatments) F test	NS	NS
<i>Test F - I × L (Sous × sous-sous traitements)</i>		
S × I × L - (Main × Sub × Sub-sub treatments) F test	NS	NS
<i>Test F - S × I × L (Traitements principaux × sous × sous-sous traitements)</i>		

* - Significant at 5% level / Significatif au seuil de 5 %. NS- Non-significant / Non significatif.

In 60 × 60 cm spacing, water requirement values at 0.3CPE/Epan ranged from 0.468 to 1.152 l/plant/day with an average of 0.792 l/plant/day. The values of 0.6CPE/Epan ranged from 0.792 to 1.404 l/plant/day with an average of 1.152 l/plant/day, while those at 0.9CPE/Epan ranged from 1.152 to 1.872 l/plant/day with an average of 1.548 l/plant/day.

In 120 × 60 cm spacing, water requirement values at 0.3CPE/Epan ranged from 0.936 to 2.304 l/plant/day with an average of 1.584 l/plant/day, at 0.6CPE/Epan ranged from 1.584 to 2.808 l/plant/day with an average of 2.304 l/plant/day, while those at 0.9CPE/Epan ranged from 2.304 to 3.744 l/plant/day with an average of 3.096 l/plant/day.

2. Water use efficiency:

The data on water use efficiency (kg/ ha-cm) are presented in Table II.

Among the main treatment effect, maximum water use efficiency was recorded in 60 × 60 cm spacing (470 kg/ ha-cm) and minimum water use efficiency was recorded in 120 × 60 cm spacing (409 kg/ ha-cm). Among the sub-treatment effect, maximum water use efficiency was recorded in drip irrigation (446 kg/ ha-cm) as compared to other treatments. Among the Sub-sub treatment effect, maximum water use efficiency was recorded in 0.3CPE/Epan (586 kg/ ha-cm) as compared to other treatments. Treatment differences in plant spacings and levels of irrigation were significant, while methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. Significant interactions were recorded for spacing × methods of irrigation, while spacing × levels of irrigation, methods × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation were non-significant.

3. Leaf yield:

The data on Leaf yield (kg/ha/crop) are presented in Table II.

Among the main effects, the highest leaf yield was recorded in 60 × 60 cm spacing (10,090 kg/ha/crop), drip irrigation (9,564 kg/ha/crop) and 0.9 CPE/Epan (10,278 kg/ha/crop) compared to other treatments. Treatment differences in plant spacings and levels of irrigation were significant, while methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. Significant interactions were recorded for spacing × methods of irrigation, while spacing × levels of irrigation, methods × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation were non-significant.

However in 60 × 60 cm spacing, drip and chapin tape irrigated plots at 0.3 Epan level recorded the leaf yield of 9,624 kg/ha/crop and 9,479 kg/ha/crop respectively which are quite more or on par with the leaf yield of furrow irrigated plots at 0.6 CPE level (9,054 kg/ha/crop) and 0.9CPE level (9,940 kg/ha/crop). Among 18 treatment combinations, the highest leaf yield was recorded in the combination of 60 × 60 cm + drip method + 0.9 CPE/Epan (11,991 kg/ha/crop).

DISCUSSION

In the present study irrigation was given at three levels based on pan evaporation values through furrow, drip and chapin tape methods to assess water requirement of mulberry. Assessment of water requirement has been done on the basis of optimum yield obtained in the treatments or treatment combinations. Significant differences among treatments in all the four crops were recorded with respect to the levels of irrigation. The highest leaf yield was recorded at 0.9 CPE/Epan level. This directly relates to the water requirement of mulberry. The increase in yield at 0.9 CPE/ Epan may be due to maintenance of soil moisture nearer to field capacity. These results are in confirmation of Suryanarayana and Kulkarni (1989).

In 60 × 60 cm spacing leaf yield obtained in the drip and chapin tape methods at 0.3 Epan is more or on par with the leaf yield obtained in furrow method at 0.6 and 0.9 CPE. This indicates the saving of 33 to 66 per cent of water in drip and chapin tape methods compared to furrow methods. This is due to the fact that the drip and chapin tape methods use water economically and water is applied to the root zone of the plants daily through pipelines. Hence there is no seepage, percolation and runoff.

Evaporation is also less in closer spacing (60 × 60 cm) because of crop canopy covering the soil surface. Among 18 treatment combinations the highest leaf yield was recorded in 60 × 60 cm spacing with drip irrigation at 0.9 Epan with an average of 1.548 l / plant / day. Similar results were observed by Saratchandra *et al.* (1992), Sikdar and Chandrashekar (1992). Mishra *et al.* (1995) reported that between two systems of irrigation significantly higher leaf yield (38,783 kg/ ha) was recorded with drip irrigation with water input at 80% of pan evaporation (PE) in closer spacing (60 × 60 cm) against furrow method.

Efficient use of irrigation water has always been an important factor in irrigation system design and operation. Efficiency of irrigation system can be evaluated on the basis of economic yield of leaf and water saving ie, water use efficiency. The highest water use efficiency was recorded in 60 × 60 cm spacing (470 kg/ ha-cm), drip irrigation (446 kg/ha-cm) and 0.3 CPE/Epan (586 kg/ha-cm) as main effect. Significant treatment differences were observed among spacings and among levels of irrigation. The results revealed that drip irrigated plots recorded maximum water use efficiency at all levels of irrigation in closer spacing. This is due to timely and frequent supplementation of water to root zone, leading to the decrease in leaching and surface evaporation and utilization of available moisture efficiently, which resulted in an increase in the leaf yield. This in turn caused higher water use efficiency. These results are in accordance with those of Muralidhar (1994) and Anantha Krishna (1995). Highest water use efficiency is mainly due to highest leaf yield and water requirement of crop. Shankar *et al.* (1996) reported that drip system of irrigation in mulberry was most efficient system resulted in saving of 20 to 40 per cent of irrigation. Higher water use efficiency was noticed in drip irrigation with alternate application of irrigation water, irrigating 40 per cent area (262 kg/ ha-cm) and lowest water use efficiency in furrow method (115 kg/ ha-cm).

CONCLUSION

It is concluded that among 18 treatment combinations, the highest leaf yield was recorded in 60 × 60 cm spacing with drip irrigation at 0.9 Epan with an average water requirement of 1.55 l/ plant/day. The drip irrigated plots recorded maximum water use efficiency at all levels of irrigation in closer spacing. Savings of 33 to 66 per cent of water were recorded in drip and chapin tape methods compared to furrow methods.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the authorities of the Institute for the facilities, and Statistical Officer for the statistical analysis.

REFERENCES

- ANANTHAKRISHNA K.H., SARPESHKAR A.M. AND MURALIDHARA H.R.(1995) Drip irrigation for mulberry cultivation. *Indian Silk*, 34(3) : 17-19.
- BONGALE U. D. (1994) Fertilizers in mulberry cultivation. Pushpa Seri Pub., Thalaghattapura, Bangalore, p. 140.
- JOLLY M. S. (1987) Appropriate Sericulture Techniques. CSR & TI, Mysore, p. 172.
- KRISHNAMANOVAR R., KHAN M. M., KARIYANNA AND SHYAMALAMMA S. (1996) Water requirement and management in horticultural crops. Proc. All India Seminar on Modern Irrigation Techniques, Bangalore, June 26-27, pp. 69-73.
- MISHRA R.K., CHOUDHURY P.C. AND GHOSH A. (1995) Scheduling of irrigation and its optimization in tropical mulberry. In: *Currtechnol Sem. Mulb & Silkworm Breed & Genet Mol Biol & Agric.*, Sept. 20-22, pp. 34.

- MURALIDHAR H.R., GUNDURAO D.S., SARPESHKAR A.M. AND RAMAIAH R. (1994) Is drip irrigation viable for mulberry cultivation – An economic analysis. *Mysore J. Agric. Sci.*, 28: 256-260.
- SARATCHANDRA B., RAJANNA L., PARAMESHA C., JAYAPPA, SABITHA M.G., PHILOMENA K.L. AND RAMESH S.P. (1992) Studies on the comparative efficiency of drip, sprinkler and furrow irrigation system on mulberry leaf yield and water economy. *Sericologia*, 32(1): 95-100.
- SHANKAR M.A., DEVAIAH M.C., PARAMESH BABU V., CHOWDEGOWDA M., CHINNASWAMY K.P. AND JANARJUNA S. (1996) Comparative performance of drip irrigation systems in mulberry. *Proceeding of All India Seminar on Modern Irrigation Techniques*, June 26-27, Bangalore, pp. 151-154.
- SIKDAR A.K. AND CHANDRASHEKAR D.S. (1992) Drip irrigation system for mulberry. *Indian Silk*, 31(5): 45-47.
- SURYANARAYANA G. AND KULKARNI K. R. (1989) Irrigation requirements of crops in different agro climatic zones of Karnataka – A climatic approach. *Current Res.*, 18(12): 167-168, UAS, Bangalore.

ETUDES SUR LE BESOIN EN EAU ET SUR L'EFFICACITE D'UTILISATION DE L'EAU AVEC DIFFERENTES METHODES ET NIVEAUX D'IRRIGATION CHEZ LE MURIER

N. SIDDALINGASWAMY¹, U. D. BONGALE¹, A. G. BANDI²,
S. N. NARAYANGOWDA & R. M. SHIVAPRAKASH

1. Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore – 560 062, Karnataka State, Inde.
2. Department of Agronomy, University of Agricultural Sciences, Bangalore – 560 065, Karnataka, Inde.

On a réalisé l'expérience avec la variété de mûrier M-5 au Karnataka State sericulture Research and Development Institute, à Bangalore pendant deux ans (1998-2000). L'expérience est conçue en 18 combinaisons de traitement, répétées chacune trois fois. Les données regroupent quatre récoltes sur deux ans pendant la saison sèche. Parmi 18 combinaisons de traitement, on enregistre le rendement foliaire le plus élevé pour l'espacement de 60 × 60 cm avec l'irrigation au goutte avec 0,9 Epan, avec un besoin moyen en eau de 1,55 l / plant / jour. Les parcelles irriguées au goutte à goutte enregistrent l'efficacité maximale d'utilisation de l'eau, avec tous les niveaux d'irrigation, avec l'espacement le plus faible. On enregistre une économie d'eau de 33 à 66 % avec les méthodes du goutte à goutte et du ruban chapin par rapport à la méthode des sillons.

INTRODUCTION

L'eau est une ressource vitale naturelle disponible sur la terre. Depuis quelques temps, la demande en eau pour l'industrie et les secteurs domestiques augmente régulièrement, ce qui pourrait empiéter sur l'eau disponible pour le secteur agricole. A l'avenir, cela va diminuer la disponibilité en eau pour l'agriculture et par conséquent, l'agriculture devra faire face au défi de produire plus, en utilisant moins d'eau. Il est donc nécessaire d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau en adoptant de nouvelles technologies comme la micro-irrigation pour les cultures agricoles commerciales, en général, et les cultures horticoles à haute valeur ajoutée, en particulier (Krishnamanohar, 1996).

On cultive le mûrier dans un vaste ensemble de sols dans des systèmes agro climatiques, topographiques et de culture variables, qui définissent ensemble les situations locales. Cela rend difficile le calcul précis des besoins en eau. Sur la base des études d'approche climatologique (Suryanarayana et Kulkarni, 1989), on estime la quantité totale d'eau requise pour le mûrier sur un hectare pendant un an à 109 cm.

MATERIELS ET METHODES

On a réalisé l'étude avec la variété de mûrier M-5 sur le campus du Karnataka State Sericulture Research and Development Institute (KSSRDI) à Bangalore pendant 2 ans (1998-2000). Sur un total de dix récoltes prises en considération pendant deux ans (1998-2000), on a observé quatre récoltes expérimentales (deux chaque année) pendant les saisons sèches. Le sol est du terreau argileux sablonneux rouge avec un pH de 7,55 et une CE de 0,47 dS / m. La capacité du terrain de 0 à 90 cm est de 24,2 % et le point de flétrissure permanent est de 14,5 % (méthode avec un appareil de plaques de pression à membranes) et une densité apparente de 1,47 g / cc (méthode d'échantillonnage au

cœur). L'expérience est conçue sur une parcelle divisée en 18 combinaisons de traitements répétées chacune trois fois.

Les détails du traitement sont les suivants :

a) Traitement principal (2) : Espacements des plants :

S1 (60 × 60 cm) ;

S2 (120 × 60 cm)

b) Sous-traitements (3) : Méthodes d'irrigation :

I1 (méthode par les sillons) ;

I2 (méthode au goutte à goutte) ;

I3 (méthode du ruban Chapin)

c) Derniers traitements (3) : Niveaux d'irrigation :

L1 (0,3 CPE / Epan) ;

L2 (0,6 CPE / Epan) ;

L3 (0,9 CPE / Epan)

(CPE – pour la méthode des sillons et Epan – pour la méthode du goutte à goutte et du ruban chapin).

On procède à l'irrigation sur la base de la lecture de l'évaporation d'une bassine ouverte pour les récoltes de la saison sèche, c'est-à-dire les 1^{ère} et 2^{ème} récoltes pour les deux années (1998-2000). Pour la méthode du goutte à goutte et du ruban Chapin, on procède à l'irrigation quotidiennement à trois niveaux (0,3 Epan, 0,6 Epan et 0,9 Epan) et pour la méthode d'irrigation par les sillons, on procède à l'irrigation une fois tous les sept jours à trois niveaux (0,3 CPE, 0,6 CPE et 0,9 CPE), en cumulant les valeurs Epan des sept jours précédents.

On procède à l'application de fumier de ferme et d'engrais chimiques et aux opérations culturales d'après l'ensemble des pratiques recommandées pour le mûrier dans des conditions d'irrigation (Jolly, 1987 ; Bongale, 1994). On procède à la récolte par la taille, en suivant une méthode par paliers pour chaque récolte, avec une hauteur basale de 30 cm à partir du sol. On enregistre le rendement foliaire en récoltant tous les plants de la micro-parcelle et on calcule le rendement en kg / ha. Pour évaluer le besoin en eau du mûrier, on calcule l'apport en irrigation comme suit (Krishnamanohar et coll., 1996) :

Quantité d'eau appliquée (litres) = Evaporation de la bassine (mm) × surface (m²)

Durée de l'irrigation pour la méthode du goutte à goutte et du ruban Chapin :

Durée d'irrigation quotidienne (heure) / unité de surface =

$$\frac{\text{Quantité d' eau appliquée (litres)}}{\text{Nbre de sorties du goutte à goutte} \times \text{taux de libération (LPH)}}$$

Pour la méthode des sillons :

Durée d'irrigation hebdomadaire (heure ou min) / unité de surface =

$$\frac{\text{Quantité d' eau appliquée (ha cm ou litres)}}{\text{Taux de libération du tuyau}}$$

Besoin en eau (ha cm / jour) = quantité d'eau appliquée (ha cm / jour) × Nbre d'irrigations + précipitations réelles (cm)

On évalue l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) pour les quatre récoltes (saisons sèches) en utilisant la formule.

$$WUE = \frac{\text{Rendement économique (kg ha}^{-1}\text{)}}{\text{Utilisation de l'eau (cm)}}$$

Ici l'unité de mesure de la quantité ou du volume de l'eau est le litre ou ha cm.

Le centimètre hectare (ha cm) est le volume d'eau nécessaire pour couvrir une surface d'1 hectare (10 000 m²) à une profondeur d'1 cm (1 ha cm = 100 m³ = 100 000 litres).

RESULTATS

1. Besoins en eau :

Les données sur le besoin en eau (ha cm ou l / jour) sont présentées dans le Tableau I.

On applique l'eau d'après le traitement et le calendrier. On enregistre le besoin en eau le plus important pour les deuxièmes récoltes des deux années et le plus faible pour la première récolte des deux années avec tous les niveaux d'irrigation. Les valeurs moyennes pour les quatre récoltes montrent le besoin maximum en eau avec 0,90 CPE / Epan (0,43 ha cm / jour), suivi par 0,60 CPE / Epan (0,32 ha cm / jour) et 0,30 CPE / Epan (0,22 ha cm / jour).

Avec l'espacement de 60 × 60 cm, les valeurs du besoin en eau avec 0,3 CPE / Epan sont comprises entre 0,468 et 1,152 l / plant / jour, avec une moyenne de 0,792 l / plant / jour. Les valeurs de 0,6 CPE / Epan sont comprises entre 0,792 et 1,404 l / plant / jour, avec une moyenne de 1,152 l / plant / jour, tandis qu'avec 0,9 CPE / Epan elles sont comprises entre 1,152 à 1,872 l / plant / jour avec une moyenne de 1,5748 l / plant / jour.

Avec l'espacement de 120 × 60 cm, les valeurs de besoin en eau avec 0,3 CPE / Epan sont comprises entre 0,936 et 2,304 l / plant / jour avec une moyenne de 1,584 l / plant / jour ; avec 0,6 CPE / Epan elles sont comprises entre 1,584 et 2,808 l / plant / jour, avec une moyenne de 2,304 l / plant / jour, tandis qu'avec 0,9 CPE / Epan, elles sont comprises entre 2,304 et 3,744 l / plant / jour avec une moyenne de 3,096 l / plant / jour.

2. Efficacité d'utilisation de l'eau :

Les données sur l'efficacité d'utilisation de l'eau (kg / ha – cm) sont présentées dans le Tableau II.

Parmi l'effet du traitement principal, on enregistre l'efficacité maximum d'utilisation de l'eau avec l'espacement de 60 × 60 cm (470 kg / ha cm) et on enregistre l'efficacité minimum d'utilisation de l'eau avec l'espacement de 120 × 60 cm (409 kg / ha cm). Parmi l'effet du sous-traitement principal, on enregistre l'efficacité maximum d'utilisation de l'eau avec l'irrigation au goutte à goutte (446 kg / ha cm), par comparaison aux autres traitements. En ce qui concerne l'effet du sous-sous traitement, on enregistre l'efficacité maximum d'utilisation de l'eau avec 0,3 CPE / Epan (586 kg / ha cm) par comparaison aux autres traitements. Les différences en fonction des espacements des plants et des niveaux d'irrigation sont significatifs, tandis que les différences entre les méthodes d'irrigation ne sont pas significatives. On enregistre des interactions significatives pour les espacements × méthodes d'irrigation, tandis que les interactions espacements × niveaux d'irrigation, méthodes × niveaux d'irrigation et espacements × méthodes × niveaux d'irrigation ne sont pas significatives.

3. Rendement foliaire :

Les données sur le rendement foliaire (kg / ha / récolte) sont présentées dans le Tableau II.

Parmi les principaux effets, on enregistre le rendement foliaire le plus important avec l'espacement de 60 × 60 cm (10 090 kg / ha / récolte), avec l'irrigation au goutte à goutte (9 564 kg / ha / récolte) et 0,9 CPE / Epan (10 278 kg / ha / récolte) par comparaison aux autres traitements. Les différences entre les traitements pour les espacements des plants et les niveaux d'irrigation sont significatives, tandis que les différences entre les méthodes d'irrigation ne sont pas significatives. On enregistre des interactions significatives pour les espacements × méthodes d'irrigation, tandis que les interactions espacements × niveaux d'irrigation, méthodes × niveaux d'irrigation et espacements × méthodes × niveaux d'irrigation ne sont pas significatives.

Cependant, avec l'espacement de 60 × 60 cm, les parcelles irriguées au goutte à goutte et avec le ruban chapin avec un niveau de 0,3 Epan enregistrent un rendement foliaire de respectivement 9 624 kg / ha / récolte et de 9 479 kg / ha / récolte, qui est supérieur ou égal au rendement foliaire des parcelles irriguées par les sillons avec un niveau de 0,6 CPE (9 054 kg / ha / récolte) et un niveau de 0,9 CPE (9 940 kg / ha / récolte). Parmi 18 combinaisons de traitements, on enregistre le rendement foliaire le plus important avec la combinaison de 60 × 60 cm + méthode d'irrigation au goutte à goutte (11 991 kg / ha / récolte).

DISCUSSION

Dans cette étude, on procède à l'irrigation à trois niveaux, d'après les valeurs d'évaporation à la bassine, avec les méthodes des sillons, du goutte à goutte et du ruban chapin pour évaluer les besoins en eau du mûrier. On procède à l'évaluation du besoin en eau, sur la base du rendement optimum obtenu avec les traitements ou avec les combinaisons de traitement. On enregistre des différences significatives entre les traitements pour les quatre récoltes par rapport aux niveaux d'irrigation. On enregistre le rendement foliaire le plus élevé avec un niveau de 0,9 CPE / Epan. Ceci est directement lié au besoin en eau du mûrier. L'augmentation du rendement avec 0,9 CPE / Epan pourrait être due au maintien d'un niveau d'humidité du sol plus proche de la capacité du terrain. Suryanarayana et Kulkarni (1989) confirment ces résultats.

Avec l'espacement de 60 × 60 cm, le rendement foliaire obtenu avec les méthodes du goutte à goutte et du ruban chapin avec 0,3 Epan est égal ou supérieur au rendement foliaire obtenu avec la méthode des sillons avec 0,6 et 0,9 CPE / Epan. Cela indique une économie d'eau de 33 à 66 % avec les méthodes du goutte à goutte et du ruban chapin, par comparaison à la méthode des sillons. Cela est dû au fait que les méthodes du goutte à goutte et du ruban chapin utilisent l'eau de manière économique et que l'eau est appliquée à la zone de la racine des plantes quotidiennement par les tuyaux. Il n'y a donc pas de déperdition, de filtration et de perte. L'évaporation est aussi moins importante avec l'espacement le plus étroit (60 × 60 cm) parce que la canopée de la culture couvre la surface du sol. Parmi les 18 combinaisons de traitements, on enregistre le rendement foliaire le plus important avec l'espacement de 60 × 60 cm, l'irrigation au goutte à goutte avec 0,9 Epan, avec une moyenne de 1,548 l / plant / jour. Saratchandra et coll., (1992) et Sikdar et Chandrashekar (1992) ont observé des résultats similaires. Mishra et coll., (1995) ont signalé qu'entre deux systèmes d'irrigation, on enregistre un rendement foliaire significativement plus élevé (38 783 kg / ha) avec l'irrigation au goutte à goutte, avec un apport en eau de 80 % d'évaporation à la bassine (PE) avec l'espacement le plus étroit (60 × 60 cm), par opposition à la méthode des sillons.

L'utilisation efficace de l'eau d'irrigation a toujours été un facteur important pour la conception et le fonctionnement d'un système d'irrigation. On peut évaluer l'efficacité du système d'irrigation, sur la base du rendement en feuilles et des économies d'eau, c'est-à-dire par rapport à l'efficacité d'utilisation de l'eau. On enregistre l'efficacité d'utilisation de l'eau la plus élevée avec l'espacement de 60 × 60 cm (470 kg / ha-cm), l'irrigation au goutte à goutte (446 kg / ha-cm) et 0,3 CPE / Epan (586 kg / ha-cm). On observe des différences de traitement significatives entre les espacements et entre les niveaux d'irrigation. Les résultats révèlent que les parcelles irriguées au goutte enregistrent l'efficacité maximum d'utilisation de l'eau avec tous les niveaux d'irrigation, avec l'espacement le

plus étroit. Cela est dû à l'apport opportun et fréquent d'eau à la zone de la racine, ce qui entraîne la diminution de l'élimination par la filtration et de l'évaporation en surface et à l'utilisation efficace de l'eau disponible, ce qui entraîne une augmentation du rendement foliaire. Cela à son tour entraîne une efficacité d'utilisation de l'eau plus importante. Ces résultats concordent avec ceux de Muralidhar (1994) et d'Anantha Krishna (1995). L'efficacité plus importante de l'utilisation de l'eau est principalement due au rendement foliaire et au besoin en eau de la culture plus élevés. Shankar et coll., (1996) ont signalé que le système d'irrigation au goutte à goutte chez le mûrier est le système le plus efficace, il permet une économie d'irrigation de 20 à 40 %. On remarque une efficacité plus importante de l'utilisation de l'eau avec l'irrigation au goutte à goutte grâce à l'application alternée de l'eau d'irrigation, qui irrigue 40 % de la surface (262 kg / ha-cm) et à la moins bonne efficacité d'utilisation de l'eau avec la méthode des sillons (155 kg / ha-cm).

CONCLUSION

On peut conclure que sur les 18 combinaisons de traitement, on enregistre le rendement foliaire le plus important avec l'espacement de 60 × 60 cm, avec une irrigation au goutte à goutte et 0,9 Epan et on observe un besoin moyen en eau de 1,55 l / plant / jour. Les parcelles irriguées au goutte à goutte enregistrent l'efficacité maximum d'utilisation de l'eau avec tous les niveaux d'irrigation pour l'espacement le plus faible. On enregistre des économies d'eau de l'ordre de 33 à 66 % avec les méthodes du goutte à goutte et du ruban chapin, par comparaison à la méthode des sillons.

A STUDY ON THE COMPARATIVE PERFORMANCE OF MICRO IRRIGATION SYSTEMS WITH FURROW METHOD IN MULBERRY CULTIVATION

N. SIDDALINGASWAMY, U. D. BONGALE, S. N. NARAYANAGOWDA,
R. M. SHIVAPRAKASH & M. N. ANANTHARAMAN

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore - 560 062, Karnataka State, India.

The experiment was conducted with M-5 mulberry variety at the campus of Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore for two years (1998-2000). The experimental design was split-split plot with 18 treatment combinations and three replications each. Pooled data of four harvests of two years for non rainy period recorded higher total shoot length/plant in 120 × 60 cm spacing (1,469 cm), drip method of irrigation (1,232 cm) and 0.9 CPE/Epan (1,333cm). Highest shoot yield was recorded in 60 × 60 cm spacing (16,216 kg/ha/crop), drip method of irrigation (15,665 kg/ha/crop) and 0.9 CPE/Epan (16,975 kg/ha/crop) as main effects. Among 18 treatment combinations the highest shoot yield was recorded in 60 × 60 cm + drip method + 0.9 CPE/Epan (19,748 kg/ha/crop). In 60 × 60 cm spacing drip irrigated plots at 0.3 Epan level recorded the shoot yield of 15,301 kg/ha/crop whereas furrow irrigated plots at 0.9 CPE level recorded the shoot yield of 15,828 kg/ha/crop. This indicates the saving of 66% of water in drip irrigation without affecting the shoot yield. Plant spacing did not influence the leaf moisture, total leaf nitrogen, leaf sugar and leaf protein. The plots with micro irrigation (drip and chapin tape) and 0.9 CPE/Epan recorded higher values on leaf moisture content, total leaf nitrogen, leaf sugar and leaf protein as compared to furrow method. The study revealed that the micro irrigation systems performed better for improvement of yield and quality of mulberry leaf with saving of 33-66% irrigation water.

Keywords: Chapin tape method, Cumulative Pan Evaporation (CPE)/ Pan Evaporation (Epan), drip method, furrow method, irrigation, mulberry, spacing.

INTRODUCTION

Mulberry is a deep rooted perennial and high biomass producing foliage plant. Irrigation is one of the influencing factors on the growth of mulberry leaves. Spacing among plants (implying plant density) in the mulberry field is an important factor to be considered for the production of good quality leaves since number of plants per unit area is a yield-determining factor. At the same time, good cocoon yield is directly related to the nutrient status or quality of mulberry leaf (Bongale, 1994; Jolly, 1987). In India rainfall is monsoon type and confined to a short period. It is uneven and often low. New irrigation technologies play a key role in agriculture economy and efficiency of water use. Among these, the drip method of irrigation has been considered the most powerful method for this. A few studies carried out on mulberry have revealed that it was possible to save up to 30-60 percent of water by adopting drip irrigation instead of furrow irrigation (Muralidhar *et al.*, 1994; Saratchandra *et al.*, 1992; Shankar *et al.*, 1996; Siddalingaswamy *et al.*, 2004). Further, because of the Indian Government policy to provide subsidy for drip irrigation facilities, there is an urgent need to take up comprehensive studies on the subject. Present study was hence undertaken.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted with M-5 mulberry variety at the campus of Karnataka State Sericulture Research and Development Institute (KSSRDI) Bangalore for 2 years (1998-2000). Out of a total of ten harvests produced during two years (1998-2000), four experimental harvests (two each for the two years) during the non-rainy periods were considered. The soil was red sandy clay loam with a pH of 7.55 and EC of 0.47 dS/m. The field capacity at 0 to 90 cm was 24.2 % and permanent wilting point was 14.5 % (pressure plate membrane apparatus method) and bulk density was 1.47 g/cc (core sampler method). The experimental design was split-split plot with 18 treatment combinations and three replications each.

The treatment details are as follows.

- a) Main treatment (2) : Plant spacings :
 - S₁ (60 × 60 cm);
 - S₂ (120 × 60 cm);
- b) Sub-treatments (3): Methods of irrigation:
 - I₁ (Furrow method);
 - I₂ (Drip method);
 - I₃ (Chapin tape method);
- c) Ultimate treatments (3) : Levels of irrigation :
 - L₁ (0.3CPE /Epan);
 - L₂ (0.6CPE /Epan);
 - L₃ (0.9CPE /Epan).

(CPE – for Furrow method, and Epan - for Drip and Chapin tape method)

Irrigation was given based on open pan evaporation daily through microirrigation systems (drip and chapin tape) and once in 7 days through furrow method for non-rainy period crops. Application of farm yard manure and chemical fertilizers and cultural practices were attended as per the package of practices recommended for mulberry under irrigated conditions (Jolly, 1987; Bongale, 1994). Harvesting was done by pruning, for every harvest by following step up method with a basal height of 30 cm from the ground. The total shoot length was measured from the base of the plant to the top most fully opened leaf. This was recorded from the base of all the shoots of a plant and mean total shoot length was calculated from the total height of all the shoot of five plants. Shoot yield was recorded by harvesting all the plants of the micro plot and the yield computed as kg/ha. Moisture content in leaf was estimated by taking fresh and dry weight of leaf and expressed in per cent (A.O.A.C., 1970). Nitrogen content of leaf was estimated by following the macro-Kjeldhal method (Jackson, 1973). The leaf sugar and leaf protein were estimated by following the method described by Willis and Yemm (1957) and Mahadevan and Sridhar (1986) respectively.

RESULTS

Growth parameter -Total shoot length per plant:

Among the main effects, the highest total shoot length per plant were recorded for treatments 120 × 60 cm spacing (1469 cm), drip irrigation (1232 cm) and 0.9 CPE/Epan (1333 cm) compared to other respective treatments. Treatment differences in plant spacings and levels of irrigation were significant, while methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. Significant interactions were recorded for spacing × methods of irrigation, while spacing × levels of irrigation, methods × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation registered non-significant interactions (Table I).

Table I. Effect of methods and levels of irrigation at different plant spacings on growth, yield and quality parameters of mulberry (mean of 4 crops).*Tableau I. Effet des méthodes et des niveaux d'irrigation avec différents espacements des plants sur la croissance, le rendement et les paramètres de qualité du mûrier (moyenne de 4 récoltes).*

Treatment	Total shoot length/plant (cm)	Shoot yield (kg/ha/crop)	Leaf moisture (%)	Total leaf N (%)	Leaf sugar (%)	Leaf protein (%)
<i>Traitement</i>	<i>Longueur totale de la pousse / plant (cm)</i>	<i>Rendement en pousses (kg / ha / récolte)</i>	<i>Humidité de la feuille (%)</i>	<i>N total de la feuille (%)</i>	<i>Sucres de la feuille (%)</i>	<i>Protéines de la feuille (%)</i>
Main tr. / Traitement principal						
S1	974	16216	72.42	2.92	11.02	21.52
S2	1469	14535	72.43	2.91	11.24	21.79
F- test	*	*	NS	NS	NS	NS
C D at 5%	11.24	789	—	—	—	—
Sub tr. / Sous traitement						
I1	1221	14989	72.06	2.85	10.75	21.72
I2	1232	15665	72.66	2.97	11.41	21.77
I3	1211	15475	72.55	2.94	11.16	21.48
F- test / Test - F	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C D at 5%						
Sub-subtr. / Sous-sous traitement						
L1	11.08	13657	71.97	2.95	10.56	21.01
L2	1224	15495	72.50	2.86	11.03	21.73
L3	1333	16975	72.80	2.95	11.73	22.23
F- test	*	*	*	NS	*	*
C D at 5%	45.43	564	0.29	—	0.32	0.44

Yield parameter - Shoot yield:

Among the main effects, highest shoot yield were recorded in 60 × 60 cm spacing (16,216 kg/ha/crop), drip irrigation (15,665 kg/ha/crop) and 0.9 CPE/Epan (16,975 kg/ha/crop) compared to other respective treatments. Treatment differences in plant spacings and levels of irrigation were significant, while methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. Significant interactions were recorded for spacing × methods of irrigation, while spacing × levels of irrigation, methods × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation revealed non-significant interactions. However in 60 × 60 cm spacing, drip irrigated plots at 0.3 Epan level recorded the shoot yield of 15,301 kg/ha/crop which is on par with the shoot yield of furrow irrigated plots at 0.6 CPE level (14,514 kg/ha/crop) and 0.9CPE level (15,828 kg/ha/crop). In wider spacing highest shoot yield was recorded in furrow method of irrigation at 0.9 CPE/Epan (16,930 kg/ha/crop). The lowest yield in drip method and chapin tape method at 0.9 Epan, which were on par (15,089 kg/ha/crop and 15,836 kg/ha/crop, respectively). Among 18 treatment combinations, the highest shoot yield was recorded in the combination of 60 × 60 cm + drip method + 0.9 CPE/Epan (19,748 kg/ha/crop).

Quality parameters:**Leaf moisture content:**

Among the main effects, high leaf moisture content were recorded in 120 × 60 cm spacing (72.43 %), drip irrigation (72.66 %) and 0.9 CPE/Epan (72.80 %) compared to other respective treatments. Treatment difference in levels of irrigation was significant, while plant spacings and methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. Significant interactions were recorded for methods × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation, while spacing × methods of irrigation and spacing × levels of irrigation recorded non-significant interactions.

Total leaf nitrogen:

Among the main effects, high total leaf nitrogen were recorded in 60 × 60 cm spacing (2.92 %), drip irrigation (2.97 %) and 0.9 CPE/Epan (2.95 %) compared to other respective treatments. Treatment differences in plant spacings, methods and levels of irrigation recorded non-significant treatment differences. The interactions, spacing × methods of irrigation, methods × levels of irrigation, spacing × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation were also recorded non-significant.

Leaf Sugar:

Among the main effects, high leaf sugar were recorded in 120 × 60 cm spacing (11.24 %), drip irrigation (11.41 %) and 0.9 CPE/Epan (11.73 %) compared to other respective treatments. Treatment difference in levels of irrigation was significant, while plant spacings and methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. The interactions, spacing × methods of irrigation, methods × levels of irrigation, spacing × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation were also recorded non-significant.

Leaf Protein:

Among the main effects, high leaf protein were recorded in 120 × 60 cm spacing (21.79 %), drip irrigation (21.77 %) and 0.9 CPE/Epan (22.23 %) compared to other respective treatments. Treatment difference in levels of irrigation was significant, while plant spacings and methods of irrigation recorded non-significant treatment differences. The interactions, spacing × methods of irrigation, methods × levels of irrigation, spacing × levels of irrigation and spacing × methods × levels of irrigation were also recorded non-significant.

DISCUSSION

In the present study, results obtained indicated that in closer spacing (60 × 60 cm), drip irrigated plots at all levels of irrigation and in wider spacing (120 × 60 cm), furrow irrigated plots at all levels of irrigations recorded the maximum total shoot length per plant which could be attributed mainly to crop canopy covering and evaporation loss from the field. These results are supported by Ananthkrishna *et al.* (1995), Saratchandra *et al.* (1992) and Shankar *et al.* (1996). Shoot yield represents above ground total biomass of mulberry, which includes both leaf and stem. Among the spacings, 60 × 60 cm spacing showed better performance with an increase of 12% on shoot yield over 120 × 60 cm spacing. In methods of irrigation, better performance was observed in drip method on shoot yield, with an increase of 25 % over furrow method of irrigation in closer spacing. In levels of irrigation, 0.9 CPE/Epan showed higher shoot yield (10-25%) than 0.6 CPE/Epan and 0.3 CPE/Epan. In 60 × 60 cm spacing drip irrigated plots at 0.3 Epan level recorded the shoot yield of 15,301 kg/ha/crop whereas furrow irrigated plots at 0.9 CPE level recorded the shoot yield of 15,828 kg/ha/crop. This indicates the saving of 66% of water in drip irrigation without affecting the shoot yield. In wider spacing due to lesser planting density and daily irrigation, evaporation was more in drip irrigated plots which causes slight reduction in shoot yield. Mishra and Chowdhury (1995)

reported that among the three levels of irrigation, significantly maximum leaf yield of 37,402 kg/ha was recorded in drip irrigation with water input of 80 % PE than that of 60 % and 40 % PE, while in furrow system, the leaf yield increased steadily with increase in frequency of irrigation.

In the present study highest leaf moisture content was recorded in drip and chapin tape irrigation compared to furrow irrigated plots due to daily irrigation. Leaf moisture content was comparatively high at 0.9 CPE/Epan level as compared to other treatments. This indicates that leaf moisture contents mainly depend on optimum or required quantity of irrigation. Saratchandra (1990) reported higher leaf moisture content in drip irrigation i.e., 71 and 81 per cent and lower leaf moisture content in furrow irrigation i.e., 69 and 73 per cent at 51.4 and 205.6 cubic metres of water applied respectively once in every 10 days. These results are also in accordance with the observation of Mishra *et al.* (2002), Muralidhar *et al.* (1994) and Shankar *et al.* (1996). Plant spacing did not influence the total leaf nitrogen, leaf sugar and leaf protein. The plots with micro irrigation (drip and chapin tape) and 0.9 CPE/Epan recorded higher values on total leaf nitrogen, leaf sugar and leaf protein as compared to furrow method. Anilkumar and John (2001) reported that varieties, levels of irrigation and soil moisture conservation practices influenced leaf protein content. Aruna (1994) reported that the drip and furrow irrigation systems resulted in almost similar nutrient status of leaves.

CONCLUSION

It is concluded that the efficiency of drip irrigation was better in 60 × 60 cm spacing i.e. 33-66 % saving of irrigation water with an increase of 25 % shoot yield over furrow method of irrigation. Among 18 treatment combinations, 60 × 60 cm plant spacing, drip irrigation and 0.9CPE/Epan combination was found to be better in over all performance compared to others. The study revealed that the micro irrigation systems performed better with 33-66% saving of irrigation water associated with improvements in yield and quality compared to furrow method.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the authorities of the Institute for the facilities, and Staff of Agronomy section for the research work.

REFERENCES

- ANANTHAKRISHNA K. H., SARPESHKAR A. M. AND MURALIDHARA H. R (1995) Drip irrigation for mulberry cultivation. *Indian Silk*, 34(3) : 17-19.
- ANILKUMAR A. S. AND JOHN P. S. (2001) Leaf quality and silkworm rearing performance as influenced by mulberry varieties, levels of irrigation and soil moisture conservation practices. *Indian J. Seric.*, 40(1) : 106-108.
- A.O.A.C. (1970) *Methods of Analysis*. Association of Official Agricultural Chemists, 9th Ed., Washington, D.C., p. 789.
- ARUNA K. P. (1994) Performance of mulberry under drip irrigation. M.Sc.(Agri.) Thesis, Bangalore.
- BONGALE U. D. (1994) *Fertilizers in mulberry cultivation*. Pushpa Seri Publications. Thalaghattapura, Bangalore, p. 140.
- JACKSON M. L. (1973) *Soil and chemical analysis*. Prentice Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi, p. 497.
- JOLLY M. S. (1987) *Appropriate sericulture techniques*. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India. pp.175.
- MAHADEVAN A. AND SRIDHAR R. (1986) *Methods in Physiological Plant Pathology*. Shivakasi Publications, Indiranagar, Madras, India, pp. 28.

- MISHRA R. K., CHOWDHURY P. C. AND GHOSH A. (1995) Scheduling of irrigation and its optimization in tropical mulberry. In : Currtechnol Sem. Mulb & Silkworm Breed & Genet Mol Biol & Agric., Sept. 20-22, pp. 34.
- MISHRA R. K., RAVINDRAN S., MADHAVA RAO AND RAJANNA L. (2002) Efficacy of drip irrigation in mulberry during non-rainy period. Advances in Indian Sericulture Research (Proc. Natl. Conf. On Strategies for Seri. Res. & Dev., Nov. 16-18, 2000, CSRTI, Mysore), pp. 224-227.
- MURALIDHARA H. R., GUNDURAO D. S., SARPESHKAR A. M. AND RAMAIAH R. (1994) Is drip irrigation viable for mulberry cultivation—An economic analysis. Mysore J. Agric. Sci., 28 : 256-260.
- SARATCHANDRA B. (1990) Water conservation techniques for irrigated mulberry gardens. Indian Silk, 28(10) : 41-43.
- SARATCHANDRA B., RAJANNA L., PARAMESHA C., JAYAPPA, SABITHA M. G., PHILOMENA K. L. AND RAMESH S. P. (1992) Studies on the comparative efficiency of drip, sprinkler and furrow irrigation system on mulberry leaf yield and water economy. Sericologia, 32(1): 95-100.
- SHANKAR M. A., DEVAIAH M. C., PARAMESH BABU V., CHOWDE GOWDA M., CHINNASWAMY K. P. AND JANARJUNA S. (1996) Comparative performance of drip irrigation systems in mulberry. Proceeding of All India Seminar on Modern Irrigation Techniques, June 26-27, Bangalore, pp. 151-154.
- SIDDALINGASWAMY N., BONGALE U. D., NARAYANGOWDA S. N. AND SHIVAPRAKASH R. M. (2004) A study on the suitability of micro irrigation systems on mulberry leaf yield and silkworm rearing. Sericologia, 44(3): 361-367
- WILLIS A. J. AND YEMM E. M. (1957) The estimation of carbohydrates in plant extracts by athrone. Biochem. J., pp. 508-514.

ETUDE SUR LA PERFORMANCE COMPARATIVE ENTRE LES SYSTEMES DE MICRO-IRRIGATION ET LA METHODE DES SILLONS DANS LA CULTURE DU MURIER

**N. SIDDALINGASWAMY, U. D. BONGALE, S. N. NARAYANAGOWDA,
R. M. SHIVAPRAKASH & M. N. ANANTHARAMAN**

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore
-560 062, Karnataka State, Inde.

L'expérience a été réalisée avec la variété de mûrier M5 sur le campus du Karnataka State Sericulture Research & Development Institute, à Bangalore pendant deux ans (1998-2000). L'expérience est conçue avec une parcelle divisée en 18 combinaisons de traitements, répétés chacun trois fois. Les données regroupées concernant quatre récoltes sur deux ans pendant la saison sèche enregistrent une longueur totale de pousses / plant plus élevée avec l'espacement de 120 × 60 cm (1469 cm), la méthode d'irrigation au goutte à goutte (1 232 cm) et 0,9 CPE / Epan (1 333 cm). Les principaux effets que l'on enregistre sont le rendement foliaire le plus élevé avec l'espacement de 60 × 60 cm (16 216 kg / ha / récolte), la méthode d'irrigation au goutte à goutte (15 665 kg / ha / récolte) et 0,9 CPE / Epan (16 975 kg / ha / récolte). Parmi les 18 combinaisons de traitement, on enregistre le rendement en pousses le plus élevé avec 60 × 60 cm + méthode au goutte à goutte + 0,9 CPE / Epan (19 748 kg / ha / récolte). Avec un espacement de 60 × 60 cm les parcelles irriguées au goutte à goutte avec un niveau d'Epan à 0,3 enregistrent un rendement foliaire de 15 301 kg / ha / récolte, tandis que les parcelles irriguées par des sillons avec un niveau de 0,9 CPE enregistrent un rendement en pousses de 15 828 kg / ha / récolte. On enregistre une économie d'eau de 66 % avec l'irrigation au goutte à goutte, sans que le rendement en pousses ne soit affecté. L'espacement des plants n'influence pas l'humidité de la feuille, l'azote total de la feuille, les sucres de la feuille et les protéines de la feuille. Les parcelles micro-irriguées (goutte à goutte et ruban Chapin) et avec 0,9 CPE / Epan enregistrent les valeurs les plus élevées pour la teneur en eau de la feuille, l'azote total de la feuille, les sucres de la feuille et les protéines de la feuille par comparaison à la méthode des sillons. Cette étude révèle que les systèmes de micro-irrigation donnent de meilleurs résultats pour l'amélioration du rendement et de la qualité de la feuille de mûrier avec une économie de l'eau d'irrigation de 33 à 66 %.

INTRODUCTION

Le mûrier est une plante pérenne à feuillage, à racines profondes, et biomasse élevée. L'irrigation est l'un des facteurs qui influence la croissance des feuilles de mûrier. L'espacement entre les plants (c'est à dire la densité des plants) dans la muraie est un facteur important à prendre en compte pour la production de feuilles de bonne qualité, puisque le nombre de plants par unité de surface est un facteur déterminant pour le rendement. Au même moment, un bon rendement en cocons est directement lié à l'état nutritionnel ou à la qualité de la feuille de mûrier (Bongale, 1994 ; Jolly, 1987). En Inde, les précipitations sont liées à la mousson et limitées à une courte période. Elles sont inégales et souvent faibles. Les nouvelles technologies d'irrigation jouent un rôle clé dans l'économie de l'agriculture et l'efficacité d'utilisation de l'eau. Parmi elles, on considère que la méthode d'irrigation au goutte à goutte est la plus efficace. Quelques études réalisées sur le mûrier ont révélé qu'il est possible d'économiser de 30 à 60 % d'eau, en adoptant l'irrigation au goutte à la place de l'irrigation par les sillons (Muralidhar et coll., 1994 ; Saratchandra et coll., 1992 ; Shankar et coll., 1996 ;

Siddalingaswamy et coll., 2004). Par ailleurs, en raison de la politique du gouvernement indien qui offre des subventions pour les installations d'irrigation au goutte à goutte, il est urgent d'entreprendre des études poussées sur le sujet. Nous avons donc entrepris cette étude.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons réalisé l'étude avec la variété de mûrier M-5 sur le campus du *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute* (KSSRDI) à Bangalore pendant 2 ans (1998- 2000). Sur un total de dix récoltes produites pendant deux ans (1998-2000), on prend en compte quatre récoltes expérimentales (deux pendant deux ans) pendant la saison sèche. Le sol est du terreau argileux sablonneux rouge avec un pH de 7,55 et une CE de 0,47 dS / m. La capacité du terrain de 0 à 90 cm est de 24,2 % et le point de flétrissure permanent est de 14,5 % et la densité apparente est de 1,47 g / cc. La conception expérimentale est une parcelle divisée en 18 combinaisons de traitements, répétés chacun trois fois.

Les détails des traitements sont les suivants :

a) Traitement principal (2) : Espacement des plants

S1 (60 × 60 cm) ;

S2 (120 × 60 cm) ;

b) Sous-traitements (3) : Méthodes d'irrigation :

I1 (méthode des sillons) ;

I2 (méthode du goutte à goutte)

I3 (méthode du ruban Chapin)

c) Derniers traitements (3) : Niveaux d'irrigation :

L1 (0,3 CPE / Epan) ;

L2 (0,6 CPE : Epan° ;

L3 (0,9 CPE / Epan).

(CPE – pour la méthode des sillons et Epan - pour la méthode du goutte à goutte et du ruban Chapin).

Pour les récoltes pendant la saison sèche, on procède à l'irrigation d'après l'évaporation quotidienne d'une bassine non recouverte pour les systèmes de micro-irrigation (goutte à goutte et ruban chapin) et une fois tous les 7 jours pour la méthode des sillons. On procède à l'application de fumier de ferme et d'engrais chimiques et on a recours aux pratiques culturales, d'après l'ensembles des pratiques recommandées pour le mûrier dans des conditions d'irrigation (Jolly, 1987 ; Bongale, 1994). On procède à la récolte par la taille pour chaque récolte, en suivant la méthode par paliers avec une hauteur basale de 30 cm à partir du sol. On mesure la longueur totale des pousses, à partir de la base du plant jusqu'à la feuille du sommet la plus ouverte. On enregistre la longueur totale à partir de la base pour toutes les pousses d'un plant et on calcule la longueur moyenne totale d'une pousse grâce à la hauteur totale de toutes les pousses obtenue pour cinq plants. On enregistre le rendement en pousses en récoltant tous les plants de la micro-parcelle et on calcule le rendement en kg / ha. On estime la teneur en eau de la feuille en prenant le poids frais et sec de la feuille et on l'exprime en pourcentage (A.O.A.C. , 1970). On estime l'azote de la feuille en suivant la méthode macro-Kjeldhal (Jackson, 1973). On estime les sucres de la feuille et les protéines de la feuille en suivant la méthode décrite respectivement par Willis et Yemm (1957) et Mahadevan et Sridhar (1986).

RESULTATS

Paramètres de croissance :

Longueur totale de la pousse par plant :

Parmi les principaux effets, on enregistre la longueur totale de pousse la plus élevée pour les traitements espacement de 120×60 cm (1469 cm), irrigation au goutte à goutte (1232 cm) et 0,9 CPE / Epan (1333 cm) par comparaison aux autres traitements respectifs. Les différences de traitement pour les espacements des plants et les niveaux d'irrigation sont significatives, tandis que les méthodes d'irrigation enregistrent des différences de traitement non significatives. On enregistre des interactions significatives pour l'espacement $\times$ méthodes d'irrigation, tandis que l'espacement $\times$ niveaux d'irrigation, les méthodes $\times$ niveaux d'irrigation et espacement $\times$ méthodes $\times$ niveaux d'irrigation enregistrent des interactions non significatives (Tableau I).

Paramètre de rendement :

Rendement en pousses :

Parmi les principaux effets, on enregistre le rendement en pousses le plus élevé avec l'espacement de 60×60 cm (16 216 kg / ha / récolte), l'irrigation au goutte à goutte (15 665 kg / ha / récolte) et 0,9 CPE / Epan (16 975 kg / ha / récolte), par comparaison aux autres traitements respectifs. Les différences de traitement pour les espacements des plants et les niveaux d'irrigation sont significatives, tandis que les méthodes d'irrigation enregistrent des différences de traitement non-significatives. On enregistre des interactions significatives pour les espacements $\times$ méthodes d'irrigation, tandis que les espacements $\times$ niveaux d'irrigation, les méthodes $\times$ niveaux d'irrigation et les espacements $\times$ méthodes $\times$ niveaux d'irrigation révèlent des interactions non significatives. Cependant, avec l'espacement de 60×60 cm, les parcelles irriguées au goutte à goutte avec un niveau d'Epan de 0,3 enregistrent un rendement en pousses de 15 301 kg / ha / récolte, qui est à égalité avec le rendement en pousses des parcelles irriguées par les sillons avec un niveau de 0,6 CPE (14 514 kg / ha / récolte) et avec un niveau de 0,9 CPE (15 828 kg / ha / récolte). Avec l'espacement le plus large, on enregistre le rendement en pousses le plus élevé avec la méthode d'irrigation par les sillons avec 0,9 CPE / Epan (16 930 kg / ha / récolte). Les rendements plus faibles avec la méthode au goutte à goutte et avec la méthode du ruban Chapin avec 0,9 Epan, sont à égalité (respectivement 15 089 kg / ha / récolte et 15 836 kg / ha / récolte). Parmi les 18 combinaisons de traitement, on enregistre le rendement en pousses le plus élevé avec la combinaison de 60×60 cm + méthode au goutte à goutte + 0,9 CPE / Epan (19 748 kg / ha / récolte).

Paramètres de qualité :

Teneur en eau de la feuille :

Parmi les principaux effets, on enregistre une teneur élevée en eau de la feuille avec l'espacement de 120×60 cm (72,43 %), l'irrigation au goutte à goutte (72,66 %) et 0,9 CPE / Epan (72,80 %), par comparaison aux autres traitements respectifs. Les différences de traitement pour les niveaux d'irrigation sont significatives, tandis que les espacements des plants et les méthodes d'irrigation enregistrent des différences de traitement non significatives. On enregistre des interactions significatives pour les méthodes $\times$ niveaux d'irrigation et pour les espacements $\times$ méthodes $\times$ niveaux d'irrigation, tandis que les espacements $\times$ méthodes d'irrigation et les espacements $\times$ niveaux d'irrigation enregistrent des interactions non-significatives.

Azote total de la feuille :

Parmi les principaux effets, on enregistre un azote total de la feuille élevé avec l'espacement de 60×60 cm (2,92 %), l'irrigation au goutte à goutte (2,97 %) et 0,9 CPE / Epan (2,95 %), par comparaison aux autres traitements respectifs. Les différences de traitement pour les espacements des plants, les méthodes et les niveaux d'irrigation ne sont pas significatives. On enregistre aussi que les

interactions entre les espacements $\times$ méthodes d'irrigation, les méthodes $\times$ niveaux d'irrigation, l'espacement $\times$ niveaux d'irrigation et l'espacement $\times$ méthodes $\times$ niveaux d'irrigation sont non significatives.

Sucres de la feuille :

Parmi les principaux effets, on enregistre des sucres élevés de la feuille avec l'espacement de 120 $\times$ 60 cm (11,24 %), l'irrigation au goutte à goutte et 0,9 CPE / Epan (11,73 %), par comparaison aux autres traitements respectifs. La différence de traitement entre les niveaux d'irrigation est significative, tandis que les espacements des plants et les méthodes d'irrigation enregistrent des différences de traitement non significatives. Les interactions entre les espacements $\times$ méthodes d'irrigation, entre les méthodes $\times$ niveaux d'irrigation, entre les espacements $\times$ niveaux d'irrigation et entre les espacements $\times$ méthodes $\times$ niveaux d'irrigation sont non significatives.

Protéines de la feuille :

Parmi les principaux effets, on enregistre des protéines élevées de la feuille avec l'espacement de 120 $\times$ 60 cm (21,79 %), l'irrigation au goutte à goutte (21,77 %) et 0,9 CPE / Epan (22,23 %), par comparaison aux autres traitements respectifs. Les différences de traitement pour les niveaux d'irrigation sont significatives, tandis que les espacements des plants et les méthodes d'irrigation enregistrent des différences de traitement non significatives. On enregistre aussi que les interactions entre l'espacement $\times$ méthodes d'irrigation, entre les méthodes $\times$ niveaux d'irrigation, entre l'espacement $\times$ niveaux d'irrigation et entre l'espacement $\times$ méthodes $\times$ niveaux d'irrigation sont non significatives.

DISCUSSION

Dans cette étude, les résultats obtenus indiquent qu'avec l'espacement le plus étroit (60 $\times$ 60 cm, les parcelles irriguées au goutte à goutte avec tous les niveaux d'irrigation et avec l'espacement le plus large (120 $\times$ 60 cm), les parcelles irriguées par les sillons avec tous les niveaux d'irrigation enregistrent la longueur totale de pousse maximale / plant, ce qui pourrait être principalement attribué à la couverture de la canopée de la culture et à la perte d'évaporation par le terrain. Ananthkrishna et coll., (1995), Saratchandra et coll., (1992) et Shankar et coll., (1996) confirment ces résultats. Le rendement en pousses représente la biomasse totale du mûrier au-dessus du sol, qui inclut à la fois les feuilles et les tiges. Parmi les espacements, l'espacement de 60 $\times$ 60 cm donne les meilleurs résultats, avec une augmentation du rendement en pousses de 12 % par rapport à l'espacement de 120 $\times$ 60 cm. Pour les méthodes d'irrigation, on observe une meilleure performance de la méthode au goutte à goutte pour le rendement en pousses, avec une augmentation de 25 % par rapport à la méthode d'irrigation par les sillons, avec l'espacement le plus étroit. Pour les niveaux d'irrigation, 0,9 CPE / Epan présente un rendement en pousses plus élevé (10 à 25 %) que pour 0,6 CPE / Epan et 0,3 CPE / Epan. Avec l'espacement de 60 $\times$ 60 cm, les parcelles irriguées au goutte avec un niveau de 0,3 CPE d'Epan, enregistrent un rendement foliaire de 15 301 kg / ha / récolte, tandis que les parcelles irriguées par les sillons avec un niveau de 0,9 CPE enregistrent un rendement en pousses de 15 828 kg / ha / récolte. Cela montre une économie d'eau de 66 % avec l'irrigation au goutte à goutte, sans effet négatif sur le rendement foliaire. Avec l'espacement le plus large, en raison de la densité inférieure de plantation et de l'irrigation quotidienne, l'évaporation est plus importante chez les plants irrigués au goutte à goutte, ce qui entraîne une légère diminution du rendement en pousses. Mishra et Chowdury (1995) ont signalé que parmi les trois niveaux d'irrigation, on enregistre un rendement significativement maximum de 37 402 kg / ha avec l'irrigation au goutte à goutte, avec un apport en eau de 80 % PE, plus qu'avec 60 % et 40 % de PE, tandis qu'avec le système des sillons, le rendement foliaire augmente régulièrement avec l'augmentation de la fréquence d'irrigation.

Dans cette étude, on enregistre la teneur la plus élevée en eau de la feuille avec l'irrigation au goutte à goutte et avec le ruban chapin grâce à l'irrigation quotidienne, par comparaison aux parcelles irriguées par les sillons. La teneur en eau de la feuille est comparativement élevée avec un niveau de 0,9 CPE / Epan par comparaison aux autres traitements. Cela indique que la teneur en eau de la feuille dépend principalement de la quantité d'irrigation optimum ou nécessaire. Saratchandra (1990) a signalé une teneur en eau de la feuille plus élevée avec l'irrigation au goutte à goutte, c'est-à-dire 71 et 81 % et une teneur plus faible en eau de la feuille avec l'irrigation par les sillons c'est-à-dire, 69 et 73 % avec 51,4 et 205,6 m³ d'eau appliquée respectivement une fois tous les 10 jours. Ces résultats sont aussi en accord avec les observations de Mishra et coll., (2002), Muralidhar et coll., (1994) et Shankar et coll., (1996). L'espacement des plants n'influence pas l'azote total de la feuille, les sucres de la feuille et les protéines de la feuille. Les parcelles micro irriguées (goutte à goutte et ruban chapin) et avec 0,9 CPE / Epan enregistrent les valeurs les plus élevées pour l'azote total de la feuille, les sucres de la feuille et les protéines de la feuille par comparaison à la méthode des sillons. Anilkumar et John (2001) ont rapporté que les variétés, les niveaux d'irrigation et les pratiques de conservation de l'humidité du sol influencent la teneur en protéines de la feuille. Aruna (1994) a rapporté que les systèmes d'irrigation au goutte à goutte et par les sillons donnent presque un état similaire en nutriments des feuilles.

CONCLUSION

En conclusion, l'efficacité de l'irrigation au goutte à goutte est meilleure avec l'espacement de 60 × 60 cm, elle permet une économie de l'eau d'irrigation de 33 à 66 %, avec une augmentation du rendement en pousses de 25 % par rapport à la méthode d'irrigation par les sillons. Parmi les 18 combinaisons de traitement, la combinaison de l'espacement des plants de 60 × 60 cm, de l'irrigation au goutte à goutte et de 0,9 CPE/ Epan s'avère meilleure pour la performance générale par comparaison aux autres. L'étude révèle que les systèmes de micro-irrigation donnent de meilleurs résultats, avec une économie de l'eau d'irrigation de 33 à 66 %, associée à des améliorations du rendement et de la qualité par rapport à la méthode des sillons.

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** ou à **sericologia@inserco.org**. 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** or to **sericologia@inserco.org**. 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.

