

# 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 L. (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. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)  
TZENOV P. (Bulgarie / *Bulgaria*)  
VAGO C. (France)  
XIA Q. (Chine / *China*)  
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)  
YUNGEN M. (Chine / *China*)

## ANTIVIRAL ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES OF SILKWORM *BOMBYX MORI* AGAINST NUCLEOPOLYHEDROSIS VIRUS – A REVIEW

K. M. PONNUVEL \*, P. R. KOUNDINYA, K. ASHOK KUMAR, R. K. SINHA  
& C. K. KAMBLE

Biotechnology Laboratory, Central Sericultural Germplasm Resources Centre, PB No 44, Thally Road, Hosur 635 109, Tamil Nadu, India

*The mulberry silkworm **Bombyx mori** larvae very often suffer from viral infections which cause heavy loss to the silk industry. The insect exhibits both cellular and humoral immune responses against protozoan, bacterial, viral and fungal diseases. It was observed that the intestinal gut juice of the insect contains digestive enzymes which are found effective against **Bombyx mori** nucleopolyhedrosis virus (BmNPV) infection. Among the gut enzymes, protease and lipases were reportedly having anti viral activity. Proteases occur naturally in all organisms and constitute 1-5% of the gene content. These enzymes are involved in a multitude of physiological reactions from simple digestion of food proteins to highly regulated cascades. Serine proteases are a class of proteases possess a serine residue in the active site of the enzyme and isoforms of this serine proteases were reported in silkworm **B. mori**. Biochemical analysis of alkalinity and protease activity of the foregut, mid gut, and hindgut indicated that higher gut alkalinity coupled with increased activity of the enzyme in the midgut of the tolerant silk worm breed. There are no reports on comparative analysis of alkaline protease activity in different silkworm breeds especially in germplasm strains. Hence, studies are underway on alkaline protease activity in different silkworm breeds and results are correlated with viral disease tolerance level. Available reports indicate involvement of red fluorescent protein (RFP) in silkworm gut juice is conferring resistance against BmNPV infection. Similarly, recent studies on serine proteases and lipases from the digestive juices of the midgut proved to have strong anti viral activity. These antiviral protein genes have already been cloned and expression levels in different tissues were analysed. The present review paper is a compendium of work conducted on digestive enzymes in offering immunity to invading BmNPV pathogens.*

### INTRODUCTION

The immunity in general may be innate or acquired. The acquired immunity of vertebrates is more specialized with "immunological memory" where as invertebrates possess innate immunity, which is characterized by non-specific immune reactions against foreign materials. The innate immunity is offered by all those elements with which an individual organism is born and is always available at a very short notice against invading foreign bodies. The elements are body surfaces such as skin, mucous membranes, chemical agents, gut juice pH, constitute effective barriers against invasion by many micro organisms. However, when the physical barriers are breached, the body

---

\* Corresponding author, Dr. K. M. Ponnuvel, Biotechnology Laboratory, Central Sericultural Germplasm Resources Centre, PB No 44, Thally Road, Hosur 635 109, Tamil Nadu, India, Phone: +91-4344-221148, Fax: +91-4344-220520, Email: kmpvel@yahoo.com

induces synthesis of anti microbial proteins, primarily by the fat body within hours following a septic injury. In general, the insect immunity consists of cellular and humoral reactions. Cellular reactions involve phagocytes, nodule formation and encapsulation by plasmatocytes and granulocytes. On the other hand, humoral reactions involve activation of the prophenol oxidase cascade and induction of immune proteins such as lysozymes, lectins, antibacterial and anti-fungal proteins.

Lepidopteron insects are targets of viruses as the number of species infected are twice compared to other holometabolic insect orders (Martignoni and Iwai, 1986). The mechanism by which the insect resists viral infections, recognizes infected cells and recruits immune cells to the infective foci or clears infected cells is poorly understood (Popham *et al.*, 2004). Insects seemingly lack any adaptive immune responses that operate analogously to the well documented antibody or histocompatibility adaptive immune responses as in vertebrates (Hoffmann, 2003).

Apoptosis or programmed cell death is one of the phenomena evolved by certain vertebrates and invertebrates to function as antiviral defense mechanism (Narayanan, 2004). This mechanism is a controlled biochemical pathway distinguishable from cell necrosis by characteristics that include cellular shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation, apoptotic body formation and fragmentation (Wyllie *et al.*, 1980). It was observed that the Lepidopteron larvae resist baculovirus infection by selective apoptosis of infected cells from the mid gut epithelial cells and by sloughing off infected cells from the midgut cells. However, many times, the virions successfully enter the host body with the help of p35 gene which is acting as anti apoptosis factor.

PKR a double stranded RNA-activated protein kinase has been extensively studied. The increased levels of PKR activity are known to induce the apoptosis in response to viral infections, thus suggesting the positive role of this protein in the induction of apoptosis. But the baculovirus has developed countermeasures to combat the anti-viral defense mechanism of the host by synthesizing anti apoptotic proteins like p35 and inhibitors of apoptosis (IAP), so as to prevent cell death induced by the insect cell apoptotic mechanism (Clem *et al.*, 1991, Prudhomme and Couble, 2002). Phenoloxidase is a highly active enzyme found in both plants and invertebrates as it is responsible for melanization / encapsulation reactions commonly seen against microorganisms and parasites (Boman & Hultmark, 1987). It is usually stored as an inactive prophenoloxidase and can be activated by bacterial peptidoglycan. Miranpuri *et al.*, (1992) observed increased phenoloxidase activity in the virus affected migratory grass hopper (*Melanoplus sanguinipes*)

#### **Nucleopolyhedrosis (BmNPV) virus and its mode of infection:**

*Bombyx mori* nucleopolyhedrosis (BmNPV) is a dreaded viral disease of the silk worm. The virus belongs to Baculoviridae family of enveloped double stranded DNA viruses infecting mostly lepidopteron insects. The virus particles are embedded in proteinaceous occlusions which are released into the larval midgut by the action of the alkaline gut pH and proteases. Infection starts when the envelope of the virus fuses with the microvillar membrane of the columnar cells. Infected midgut cells produce virions studded with viral encoded glycoprotein which is important for infection of neighbouring host cells and tissues ( Monsama *et al.*, 1996) The high temperature and high humidity coupled with poor sanitary conditions prevailing in the tropics results in frequent loss of cocoon crops on account of different diseases (Savanurmah *et al.*, 1995, Sivaprakasam and Rabindra 1995, Subbarao *et al.*, 1991), of which viral diseases alone account for 33% loss (Samson *et al.*, 1990). It was observed that bivoltine silkworms are more easily becomes susceptible to viral diseases compared to polyvoltine breeds (Liu Shixian 1984, Sivaprakasam and Rabindra 1995). The initial defense mechanism against pathogens *per os* could be expected in the tissues along the alimentary canal especially in the digestive juice (Uchida *et al.*, 1984).

#### **Intestinal proteases in the digestive juice:**

Lepidopteran larvae demonstrate several remarkable specializations of the alimentary canal; the most active epithelial transport known, called a goblet cell and the highest pH values known to be



generated by a biological system, which protects the host from the invading pathogens. Several larval midgut proteases have been described from different species of Lepidoptera (Ishaaya *et al.*, 1971); Ahmad *et al.*, 1980; Pritchett *et al.*, 1981; Eguchi and Kuryama, 1985; Houseman *et al.*, 1989; Wolfson and Murdock, 1990; Christeller *et al.*, 1992; Purcell *et al.*, 1992). The digestive enzymes of insects are active at the extremely high alkaline pH (10-12) observed in the midgut (Dow, 1984). This differs from the mammalian digestive enzymes, such as bovine trypsin, which has optimum pH of 7.5 (Crewther, 1953) and starts to lose activity at a pH > 10 (Wang and Carpenter, 1967). All proteases characterized both in crude homogenate and purified forms were found to be at pH 10 to 11 (Eguchi and Iwamoto *et al.*, 1976). Proteolytic enzymes are demonstrated in many insects and most insect proteinases are proved to be active at neutral or alkaline pH (Day and Waterhouse, 1953; Gilmour 1961; Brookes 1961; Srivastava & Auclair 1963; Pfleiderer & Zwilling 1966; Gooding and Huang 1969).

In the silkworm, *Bombyx mori*, the presence of intestinal proteinases was first reported by Shinoda (1930) and by many others (Horie *et al.*, 1963; Eguchi and Yoshitake, 1967; Hamano and Mukaiyama, 1970; Nishida and Hayashiya, 1974, Eguchi and Iwamoto 1976). Studies conducted on midgut proteases of the pharate adult of *B. mori* (Eguchi *et al.*, 1972; Eguchi & Iwamoto 1975a) and *Antheraea pernyi* (Eguchi & Iwamoto 1973) suggested their utilization as a source of the cocoon digesting enzyme. The nature of mid gut proteases of pharate adult and alimentary canal of the silkworm larvae differs from each other in respect of higher pH at 11.2 prevailing in the alimentary canal compared to pharate adult enzyme pH at 9. Further, it was reported that protease in the midgut tissue and digestive fluid increase with the increasing feeding from 1<sup>st</sup> to 5th instar. Changes in the proteolytic activity in the midgut and digestive fluid contents were analysed in the silkworm. The activity of the enzyme disappears in the pupal stage and reaches the peak 1 or 2 days before emergence (Eguchi and Iwamoto *et al.*, 1976). Watanabe *et al.*, (1990) found many other gut enzymes like sucrases, cellulases, and phosphatases have antiviral properties.

It has been known that silkworm in its fifth larval instar exhibits strong alkaline proteolytic activity in the midgut tissue and digestive fluid (Eguchi and Iwamoto 1976). The characteristics of the antiviral substances in the silkworm gut juice against BmNPV were described by Funakoshi & Aizawa (1989). A correlation between alkaline protease activity and higher tolerance against BmNPV was established (Datta *et al.*, 2000). A parallel relationship between protease activity and anti-NPV reaction was observed in *B. mori* by Watanabe (1986) and suggested that the antiviral effect of the gut juice was due to its protease enzyme. Sen *et al.*, (1996) studied the alkaline protease activity of fifty breeds of the silkworm, their susceptibility to BmNPV and found a positive correlation between the quantum of alkaline protease activity and survival of silkworm when challenged with the virus. Ponnuvel *et al.*, (1999) indicated that tolerance to BmNPV infection is positively correlated with alkaline protease activity, and that the enzyme is more active in the midgut of the tolerant silkworm breed. The inhibitory antiviral property of digestive juice of *B. mori* was first reported by Suzuki (1936), which was later confirmed by Aizawa 1962, Aruga and Watanabe 1964. It has been established that red fluorescent protein (RFP) (Hayashiya *et al.*, 1968, 1971, 1978) and alkaline protease activity in the silkworm gut juice exhibited antiviral activity (Funakoshi & Aizawa 1989).

### **Antiviral proteins of silkworm gut juice:**

#### **1. Role of Red fluorescent protein in antiviral immunity:**

A red fluorescent protein (RFP) in *B. mori* gut juice was first reported by Mukai *et al.*, (1969) which was found to possess antiviral activity against BmNPV (Hayashiya *et al.*, 1972). The separation of NPV precipitating protein from RFP, its purification and virus inactivating property of the purified protein was described (Uchida *et al.*, 1984). The RFP biosynthesis was demonstrated *in vitro* from 3 compartments, a protein from the midgut larvae, Chlorophyll-a, and a basic protein from the chloroplast of green leaves (Hayashiya *et al.*, 1976). The RFP consisting of Chlorophyllid—a derived from chlorophyll-a was suggested to play an essential role in antiviral activity against BmNPV

(Hayashiya *et al.*, 1976a, 1976b). The protein was observed to bind to the prosthetic group of the chlorophyll known as Chlorophyllid A binding protein (ChBP), a new category of proteins from lipocalin family known as pentadecacalin (Mauchamp *et al.*, 2006). The ChBP gene spanned 45.5 kb of DNA and consisted of 46 exons. The cDNA encoded a protein of 2721 amino acids. A different RFP (65 kDa) having antiviral activity against *BmNPV* was also purified (Sethuraman *et al.*, 1993). Hou and Chiu (1986) postulated that RFP is having more than one midgut protein and antiviral activity of RFP in silkworm gut juice is attributed to phospholipase-C (PLC). Although the exact mechanism of the antiviral action of RFP is still unknown, it is believed that it destroys the nucleocapsid of NPV or blocks the multiplication of NPV or agglutinates the virus and is excreted along with faeces. Further efforts are needed to know the exact mechanism of the protein in inhibiting the multiplication of *BmNPV* and identifying the genes responsible for production of RFP. The possibilities of increasing the production of RFP either naturally or by fortifying adjuncts along with mulberry leaves may also be explored (Yao *et al.*, 2006). An attempt in this direction would pave the way to make sericulture industry more profitable and sustainable (Jayaprakash and Rachappa, 2000). Experiments revealed that RFP is detected only in the digestive juice of the mulberry leaf fed larvae but not found in the juice of larvae fed on artificial diet without mulberry leaf powder. It was observed that silkworm larvae reared continuously in the dark are more susceptible to peroral infection with NPV than those reared continuously in environment with light. The increased susceptibility may be due to absence or lower production of RFP in the larvae reared in the dark.

## 2. Role of serine proteases:

Serine proteases are a class of enzymes characterized by the presence of an invariant catalytic triad consisting of three amino acids i. e., His, Asp, and Ser. These serine proteases play an important role in the regulation of immune and coagulation responses by proteolytically cleaving and activating subsequent members of these pathways. Serine proteases are important in the interactions of insect disease vectors and parasites (Paskewitz *et al.*, 1999). In silkworm, two types of serine proteases namely digestive proteases and non digestive proteases were reported. The digestive serine proteases of the digestive juice are mainly involved in digestion of food, and active at high alkaline pH. The non digestive serine proteases are group of proteins available in the haemolymph that regulate several defense responses including haemolymph coagulation, antimicrobial peptide synthesis and melanization of pathogen surfaces and active at neutral pH (Gorman and Paskewitz, 2001). The proteases in the digestive juice of silkworm were isolated, purified and the physio-chemical and enzymatic characters were reported (Sasaki & Suzuki 1982). This review mainly focuses on digestive serine protease which is also involved in antiviral defense mechanism.

In silkworm larval digestive juice, alkaliphilic trypsin like serine protease exists showing its maximum activity at about pH 10 (Sasaki & Suzuki 1982). The amino acid sequences of silkworm trypsin like alkaliphilic serine protease from larval digestive juice were reported (Sasaki *et al.*, 1993). Kotani *et al.*, (1999) have investigated biochemical characteristics, cloned and sequenced a cDNA encoding for the protease. The alkaline protease activity was estimated as per the method of Eguchi and Iwamoto (1976) in the gut juice of *BmNPV* tolerant and susceptible silkworm races. The midgut region shows maximum alkaline protease activity compared with foregut and hind gut (Ponnuvel *et al.*, 1999). Further, the increased protease activity was observed in the digestive juice of the tolerant breed compared to susceptible breed. These results are in conformity with earlier published work, indicating midgut protease activity plays an important role in the antiviral mechanism in the silkworms.

Nakazawa *et al.*, (2004) showed that serine protease in the digestive juice of silkworm larvae have strong anti viral activity against *BmNPV*, which was designated as BmSP-2. They reported that there may be about five serine protease isoforms including BmSP-2. The molecular mass of this protein was 24271 Da. Partial N-terminal amino acid sequence of the protein was determined and cDNA was cloned based on the amino acid sequence. A homology search of the deduced amino acid

sequence of the cDNA showed 84% identity with *B. mandarina*. Analysis of BmSP-2 gene expression showed that this gene is expressed in the midgut but not in other tissues. In addition, BmSP-2 gene was not expressed in the molting and wandering stages, indicating that the gene is hormonally regulated. The results suggest that BmSP-2, an insect digestive enzyme, can be a potential antiviral factor against BmNPV at the initial site of viral infection.

Phylogenetic analysis using CLUSTALW and MEGA3 programmes showed that the *Bombyx* serine protease is strongly aligned with serine protease amino acid sequences of other lepidopteran insects, especially with *B. mandarina*, an ancestor of present day domesticated silkworm. The dipteran insects serine protease sequences are grouped in a single cluster, whereas the lepidopteron insects are clustered separately (Fig -1). The results indicate that the serine protease genes were conserved across the insect taxa suggesting their possible involvement in immune responses. The information may be of use for the development of disease resistance silkworms by transforming the wild heterologous disease resistant genes from more closely related genera through conventional breeding or by biotechnological approach. The PCR amplification was performed using gene specific primers and genes were amplified in all selected silkworm races. The PCR products were in same molecular weight, indicating that the gene sequences are highly conserved within silkworm races (Ponnuvel *et al.*, 2005).

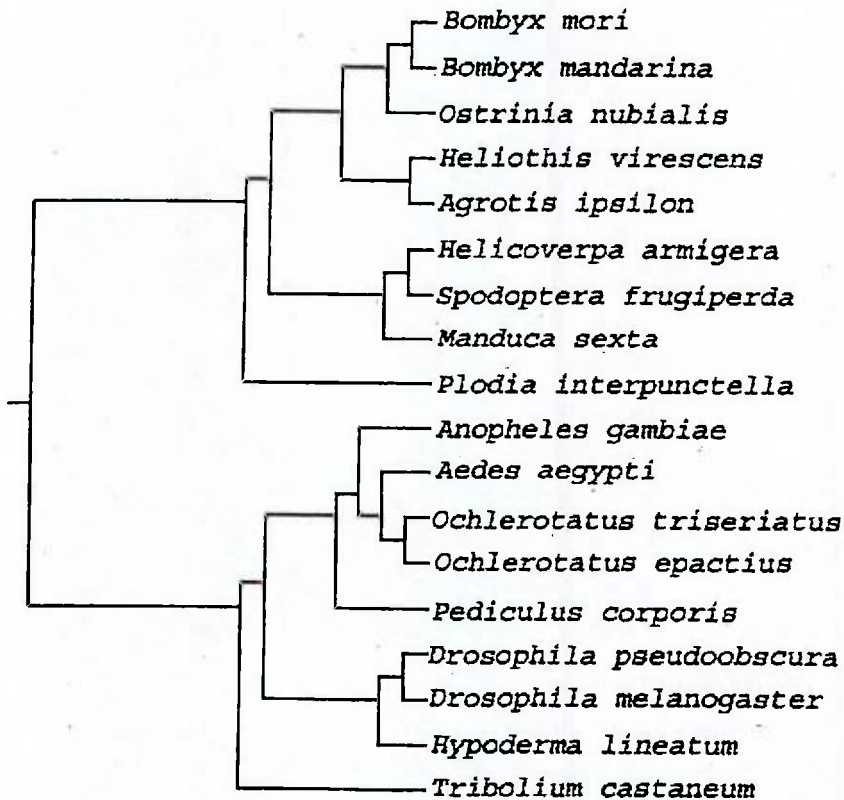


Figure 1. Phylogenetic relationship of *Bombyx mori* alkaline protease gene with other insect protease genes.

Figure 1. Relation phylogénétique entre le gène de la protéase alcaline de *Bombyx mori* et les gènes de la protéase d'autres insectes.



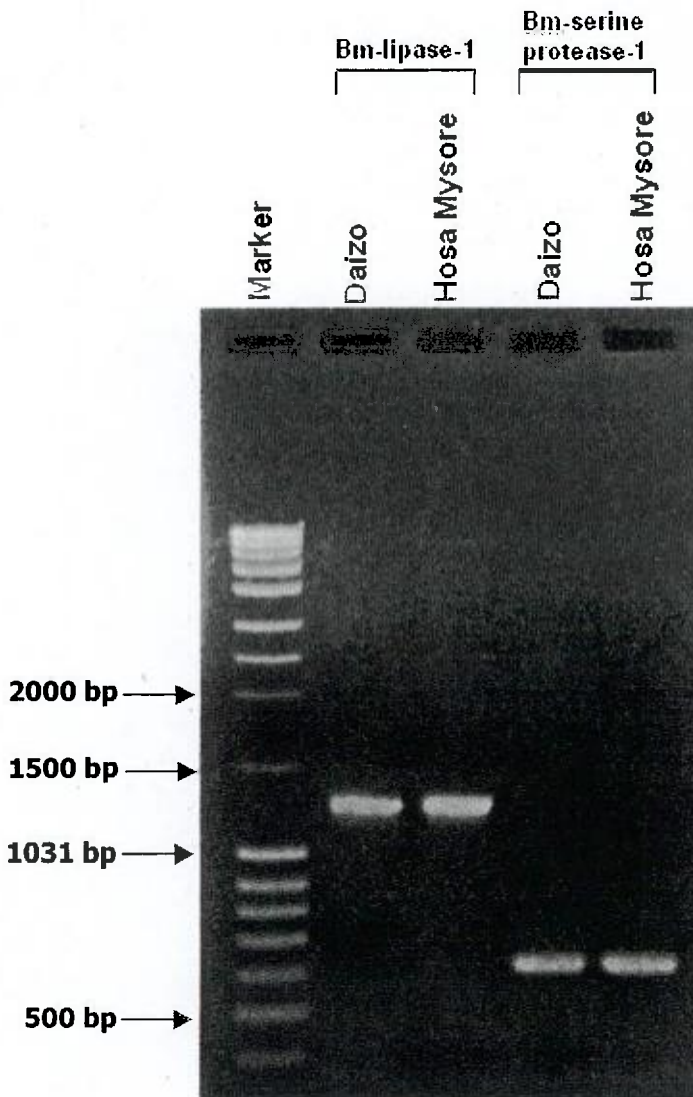


Figure 2. PCR amplified product of Bm-lipase and Bm-serine protease gene in two different silkworm races of *Bombyx mori*.

Figure 2. Produit PCR amplifié du gène de la protéase de Bm-lipase et de Bm-sérine chez deux races différentes de *Bombyx mori*.

### 3. Role of Lipases in antiviral activity:

An antiviral protein against BmNPV was purified from the digestive juice of *B. mori* larvae (Ponnuvel *et al.*, 2003). A homology search of the deduced amino acid sequence of the protein cDNA revealed 56% homology with *Drosophila melanogaster* lipase and 21% homology with human lipase. As lipase activity of the protein was confirmed in vitro, this protein was designated Bmlipase-1. Northern blot analysis showed that the Bmlipase-1 gene is expressed in the midgut but not in other tissues and it is constitutively expressed. Similar to serine protease (Bm SP-2), the lipase is also not expressed in the molting and wandering stages. The results suggest that an insect digestive enzyme has potential as a physiological barrier against BmNPV at the initial site of viral infection.

The presence of antiviral proteins in germplasm stocks was analysed. The gene specific primers of antiviral proteins like Bmlipase -1, and Bmserine protease (BmSp-2) were designed and the PCR reaction was performed using genomic DNA as template (Fig-2). The PCR amplified product was analyzed in agarose and the amplified fragment was sequenced. The sequences of antiviral genes varied from race to race and the sequence homology analysis indicate that the multivoltine and bivoltine are segregated in the two separate groups (Ponnuvel *et al.*, 2005). The study indicated that antiviral gene may probably be used as genetic marker to characterize silkworm germplasm stocks.

## CONCLUSION

The nucleopolyhedrosisvirus (BmNPV) is considered as the most dreaded viral disease in the sericulture industry. The disease very often causes severe economic loss. The disease causing virions usually enter per orally through the contaminated food in to the alimentary canal, where it will encounter defense from the silkworm body. High temperature and high humidity of the tropical regions are conducive to the proliferation of polyhedra. Since the disease cannot be prevented/controlled, use of disease resistant silkworm lines is the only alternative to get successful cocoon crops in the tropics. Scientists all over the world are working very hard to identify the genetic mechanism underlying disease tolerance and inheritance pattern of the genes controlling the resistance. Depending upon the genetic mechanism, a suitable breeding strategy can be adopted effectively to transgress disease resistance character in to the productive silkworm breeds which other wise are very susceptible. Enormous work has been conducted on silkworm immunity, yet mulberry silkworm is considered to have a weak immune system. However, available reports indicate that the silkworm does have efficient immune system against viral diseases. The immune factors of the digestive juice such as high alkalinity, high protease activity, RFP, Bmlipase-1, Bmserine protease-2 could act as viral inhibiting factors against BmNPV virus. However, viral resistance is polygenic in nature. Hence, it is necessary to identify major contributing factors for viral resistance, so that these factors can be introduced into the susceptible breeds through conventional breeding or biotechnological approaches to get disease resistant silkworm lines for further development of sericulture industry.

## REFERENCES

- AHMED J., SALEEMUDDIN M., SIDDI M. (1980) Purification and characterization of 3 alkaline proteases from the gut of larva of army worm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochem*, 10, 667-673.
- AIZAWA K. (1962) Antiviral substance in the gut-juice of the silkworm. *J. Insect Pathol*, 4, 72-76.
- ARUGA H., WATANABE H. (1964) Resistance to *per os* infection with cytoplasmic polyhedrosis virus in the silkworm *Bombyx mori*. *J Insect Pathol*, 6, 387-394.
- BOMAN H.G., HULTMARK D. (1987) Cell free immunity in insects. *Ann Rev Microbiol*, 41, 103-126.
- CHRISTELLER J.T., LAING W.A., MARKWICK N.P., BUGESS E.P.J., (1992) Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae, dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem Mol Biol*, 22, 735-746.
- CLEM R.J., FECHHEIMER M., MILLER, L.K. (1991) Prevention of apoptosis by baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 254(5036), 1388-1390.
- CREWETHER W.G. (1953) The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin. *Austral J Biol Sci*, 6, 597-616
- DATTA R K., PONNUVEL K.M., JAIN A.K. (2000) Purification and characterization of antiviral protein in the gut juice of silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 40,61
- DOW J.A.T. (1992) pH gradients in lepidopteran midgut. *J Exp Biol*, 172,355-375
- EGUCHI M., IWAMOTO A., (1976) Alkaline proteases in midgut tissue and digestive fluid of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biochem*, 6, 491-496



- EGUCHI M., IWAMOTO A. (1982) Comparison of three alkaline proteases from digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Comp Biochem Physiol B*, 71(4), 663-668.
- EGUCHI M., KURIYAMA K. (1985) Purification and characterization of membrane-bound alkaline proteases from midgut tissue of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biochem*, 97(5), 1437-45.
- EGUCHI M., FURUKAWA S., IWAMATO A. (1972a) Proteolytic enzymes in the midgut of pharate adult of silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol*, 18, 2457-2467.
- EGUCHI M., IWAMATO A. (1975a) Hydrolysis of solubilized fibroin and silk proteins in the midgut of the pharate adult of *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 21, 577-588.
- EGUCHI M., IWAMATO A. (1973). Occurrence of proteases in the midgut of pharate adult of *Anthereae pernyi*. *Appl Entmol. Zool*, 8, 48-40
- FUNAKOSHI M., AIZAWA K. (1989) Antiviral substances in the silkworm gut juice against a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Invertebr. Pathol*, 54(2), 151-155.
- GILMOUR D. (1961). The biochemistry of insects. Academic Press New York pp53-58
- GORMAN M.J., PASKEWITZ S.M. (2001) Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect. Biol. Mol. Biol*, 31(3), 257-262
- HAYASHIYA K., NISHIDA J. (1968) Inactivation of nuclear polyhedrosis virus in the digestive of larvae reared on natural and artificial diets. *J. Appl. Entomol. Zool*, 12, 189-193 (in Japanese).
- HAYASHIYA K., MATSUBARA F. (1971) Comparative experiments with the silkworm larvae reared on mulberry leaves and artificial diets: comparison of antiviral activities in the digestive juice of larvae reared on natural and artificial diets. *Bull. Fac. Text. Sci.*, 6, 87-100.
- HAYASHIYA K., NISHIDA J., UCHIDA U, 1976a. The mechanism of formation of the red fluorescent protein in the digestive juice of the 3rd silkworm larvae – The formation of chlorophyllide-a. *J. Appl. Entomol. Zool.*, 20, 37-43
- HAYASHIYA K., NISHIDA J., UCHIDA U. (1976b) Comparison of antiviral activities of the Silkworm larvae reared in light and in darkness in relation to the formation of red fluorescent protein (RFP). *J. Appl. Entomol. Zool.*, 20, 139-143.
- HOFFMANN J.A. (2003) The immune response in *Drosophila*. *Nature*, 426(6962), 33-38.
- HOFFMANN J.A., KAFATOS F.C., JANEWAY C.A., EZEKOWITZ R.A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418), 1313-1318.
- HORIE Y., TANAKA M., ITO T. (1963). Proteolytic enzymes of digestive juice in the midgut of the silkworm *Bombyx mori*. *J. sericult. Sci. Jpn.*, 32,8-15.
- HOU R F., CHIU C S. (1986) Antiviral proteins in the midgut of silkworm *Bombyx mori* fed on different food sources. *Entomol. Exp. Appl.*, 42,3-8
- HOUSEMAN J.G., PHILOGENE B.J.R., DOWNE A.E.R. (1989) Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Can. J. Zool.*, 67, 864-868.
- ISHAYA I., MOORE I., JOSEPH D. (1971) Protease and amylase activity in larvae of Egyptian cotton worm, *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.*, 17, 945-953
- JAYAPRAKASH, R.M., RACHAPPA, K.D., 2000. Virus inactivating protein RFP. *Indian Silk*, 4, 11-12.
- KOTANI E., NIWA T., TOKIZANE M., SUGA K., SUGIMURA Y., ODA K., MORI M., FURUSAWA T. (1999) Cloning and sequence of a cDNA for a highly basic protease from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 8, 299– 304.
- MARTIGNONI, M.E., IWAI, P.J. 1986. A Catalogue of Viral Diseases of Insects, Mites and Ticks. *In: General Technical Report PNW-195*, 4th Ed. United States Northwest Research Station, Portland.
- MAUCHAMP B., ROYER C., GAREL A., JALABERT A., DA ROCHA M., GRENIER AM., LABAS V., VINH J., MITA K., KADONO K., CHAVANCY G. (2006) Polycalin (chlorophyllid A binding protein): a novel, very large fluorescent lipocalin from the midgut of the domestic silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36(8), 623-633.
- MIRANPURI G.S., ERLANDSON M.A., GILLESPIE J.P., KHACHATOURIANS G.G. (1992) Changes in hemolymph of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, infected with an entomopoxvirus. *J. Invertebrate Pathol.*, 60, 274–282.

- MONSMA S.A., OOMENS A.G., BLISSARD G.W. (1996) The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J. Virol.*, 70(7), 4607-4616.
- MUKAI J., INOUE J., AKUNE S. (1969) A red, fluorescent protein from silkworm. *Agric. Biol. Chem.*, 33, 125-127.
- NAKAZAWA H., TSUNEISHI E., PONNUVEL K.M., FURUKAWA S., ASAOKA A., TANAKA H., ISHIBASHI J., YAMAKAWA M. (2004) Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *B. mori* larvae against NPV. *Viol.*, 321(1), 154-162.
- NARAYANAN K. (2004) Insect resistance: its impact on microbial control of insect pests. *Current Science*, 86(6), 800-814.
- NISHIDA J., HAYASHIYA K. (1974) On the enzyme activity in the digestive juice of larvae of different 12 silkworm strains. *Bull. Kyoto University Ind. arts Text. Fib.*, 7, 235-239.
- PONNUVEL K.M., KUMAR V., BABU A.M., DATTA R.K. (1999) Effect of alkalinity and protease in the digestive juice of silkworm, *B. mori* on BmNPV infection. *Ital. J. Zool.*, 66 121-124
- PONNUVEL K.M., NAKAZAWA H., FURUKAWA S., ASAOKA, A., ISHIBASHI J., TANAKA H., YAMAKAWA M. (2003) A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* 77, 10725- 10729.
- PONNUVEL K. M., YAMAKAWA M., VELU D., SARAVANAKUMAR R, THANGAVELU K. (2005) Alkaline protease gene of silkworm *Bombyx mori* and its genomic organization, nucleotide sequence and ORFs. Proceedings of 20<sup>th</sup> Conf. ISCC held in Bangalore. Vol III, pg 8-12.
- POPHAM H.J.R., SHELBY K.S., BRANDT S.L., COUDRON T.A. (2004) Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 85, 2255-2261
- PRITCHETT D. W., YOUNG S.Y., GREEN C.R. (1981) Proteolytic activity in the digestive fluid of larvae of *Tricoplusia ni*. *Insect Biochem*, 11, 523-526
- PRUDHOMME J.C., COUBLE P. (2002) Perspectives in silkworm transgenesis. *Curr. Sci.*, 83(4), 432-438.
- PURCELL J.P., GREENPLATE J.T., SAMMONS R.D., (1992) Examination of midgut luminol proteinase activities in 6 economically important insects. *Insect Biochem Mol Biol.*, 22,41-47
- SAMSON M.V, BAIG M, SHARMA S.D., BALVENKATASUBBAIAH K., JOLLY M.S. (1990) Survey on the relative incidence of silkworm diseases in Karnataka. *Indian J. Sericult.*, 29(2), 248-254,
- SASAKI T., HISHIDA T., ICHIKAWA K., ASARI S. (1993) Amino acid sequence of alkaliphilic serine protease from silkworm, *Bombyx mori*, larval digestive juice. *FEBS Lett.* 320(1), 35-37.
- SASAKI T, SUZUKI Y. (1982) Alkaline proteases in digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Acta.*, 703(1), 1-10.
- SAVANURMATH C.J., BASAVARAJAPPA S., HINCHINGENEGIRI, S.B., INGALAPALLI, S.S., SINGH K. K., SANKAL R. D. ( 1995) Predisposing factor for viral diseases of the silkworm, *Bombyx mori* under agroclimatic conditions of north Karnataka. *Indian. J Seric.*, 34 (2), 93-99.
- SEN R., PATNAIK A K., MAHESWARI M., DATTA R K. (1997) Susceptibility status of the silkworm *B. mori* germplasm stocks in India to BmNPV. *Indian J. Seric.* 36, 51-54
- SETHURAMAN N. B., NAGARAJU J., DATTA R.K. (1993) Purification and partial characterization of antiviral protein in silkworm, *Bombyx mori*. *Indian J. Seric.* 32, 63-67.
- SHINODA O (1930) Contributions to the knowledge of intestinal secretions in insects-III on the digestive enzymes of the silkworm. *J. Biochem.*, 11, 345-36
- SHIXIAN L (1984) Identification on the resistance of silkworm, *Bombyx mori* races to six types of silkworm diseases. *Sericologia*, 24 (3), 377-382
- SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R. J. (1995) Incidence of grasserie in silkworm *Bombyx mori* in selected districts of Tamilnadu. *Ind. J. Seric.*,34 (2), 100-104

- SRIVASTAVA P.N., AUCLAIR J.L. (1963) Characterization and nature of proteases from the alimentary canal of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *J. Insect Physiol.*, 9, 469-474
- SUBBA RAO G., CHANDRA A.K., BHATTACHARYA J. (1991) Incidence of crop loss from adopted rearers level in West Bengal due to silkworm diseases. *Indian J. of Sericult.*, 34(2), 167-170.
- SUZUKI K. (1936) Researches on the silkworm polyhedrosis, I-VII. *Bull. Kyoto Sericult. College* 1, 225-338.
- UCHIDA Y., KAWAMOTO F., HIMENO M., HAYASHIYA K. (1984) A virus inactivating protein isolated from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. 43, 182-189
- WANG S., CARPENTOR F. H. (1967) Kinetics of the cryptic hydrolysis of oxidized b-chain of bovine insulin. *Biochemistry*, 6, 215-224
- WATANABE H., WANG Y., NAGATA M. (1989) Comparative susceptibilities to a nuclear polyhedrosis virus in silkworm *B. mori* reared on mulberry leaves and artificial diets. *J. Sericult. Jpn.*, 58, 107-114
- WATANABE H. (2002) Genetic resistance of the silkworm *Bombyx mori* to viral diseases. *Curr. Sci.* 83(4), 439-441
- WATANABE H. (1986). Resistance of silkworm *B. mori* viral infections. *Agric. Eco systems. Environ.* 15, 131-139
- WOLFSON MURDOCK (1990) Diversity in digestive proteinase activity in among insects. *J. Chem. Ecol.*, 16, 1089-2202
- WYLLIE A.H., KERR J.F.R., CURRIE A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68,251-306.
- YAO H., WU X., GOKULAMMA K. (2006) Antiviral activity in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *J. Zhejiang Univ. Science* 7, 350-356



## REVUE SUR L'ACTIVITE ANTIVIRALE D'ENZYMES DIGESTIFS DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* CONTRE LE VIRUS DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE

K. M. PONNUVEL\*, P. R. KOUNDINYA, K. ASHOK KUMAR, R. K. SINHA & C. K. KAMBLE

Biotechnology Laboratory, Central Sericultural Germplasm Resources Centre, PB NO. 44, Thally Road, Hosur 635 109, Tamil Nadu, Inde.

*Les larves du ver à soie du mûrier **Bombyx mori** souffrent très souvent d'infestations virales, qui entraînent des pertes importantes pour l'industrie de la soie. L'insecte présente à la fois des réponses d'immunité cellulaire et humorale contre les maladies protozoaires, bactériennes, virales et fongiques. On a observé que le liquide intestinal de l'insecte contient des enzymes digestifs, qui s'avèrent efficaces contre l'infestation par le virus de la polyédrose nucléaire (BmNPV). Parmi les enzymes de l'intestin, on a rapporté que les protéases et les lipases ont une activité antivirale. Les protéases sont présentes, à l'état naturel, dans tous les organismes et représentent 1 à 5 % des gènes. Ces enzymes sont impliqués dans une multitude de réactions physiologiques, de la simple digestion des protéines alimentaires à des cascades très régulées. Les protéases à sérine sont une classe de protéases, qui possèdent un résidu sérine dans le site actif de l'enzyme et des isoformes de ces protéases à sérine ont été trouvées chez le ver à soie **B. mori**. L'analyse biochimique de l'alcalinité et de l'activité des protéases de l'intestin antérieur, de l'intestin moyen et de l'intestin postérieur indique une alcalinité plus élevée, associée à une augmentation de l'activité de l'enzyme dans l'intestin moyen chez une lignée de ver à soie tolérante. Il n'existe pas de rapport sur l'analyse comparative de l'activité des protéases, chez différentes lignées de vers à soie. On a donc entrepris des études sur l'activité des protéases alcalines chez différentes lignées de vers à soie et les résultats sont corrélés avec le niveau de tolérance à la maladie virale. Les rapports disponibles indiquent l'implication de la protéine fluorescente rouge (RFP) dans le liquide intestinal du ver à soie qui apporte une résistance contre l'infestation par BmNPV. De même, les études récentes sur les protéases à sérine et sur les lipases des liquides digestifs de l'intestin moyen prouvent qu'elles ont une forte activité antivirale. On a déjà cloné ces gènes de protéines antivirales et on a analysé les niveaux d'expression dans différents tissus. Cette revue est un condensé des travaux réalisés sur les enzymes digestifs, qui apportent une immunité au pathogène BmNPV.*

### INTRODUCTION

L'immunité en général peut être innée ou acquise. L'immunité acquise des vertébrés est plus spécialisée avec « une mémoire immunologique », tandis que les invertébrés possèdent une immunité innée, qui est caractérisée par des réactions immunitaires non spécifiques contre les matières étrangères. Tous ces éléments avec lesquels un organisme individuel naît et qui sont toujours disponibles à court terme contre les corps étrangers envahissants, apportent une immunité innée. Les éléments sont des surfaces corporelles telles que la peau, les membranes muqueuses, les agents

\* Auteur auquel adresser la correspondance : Dr K. M. Ponnuvel, Biotechnology Laboratory, Central Sericultural Germplasm Resources Centre, PB No.44, Thally Road, Hosur 635 109, Tamil Nadu, Inde. Ph: + 91-4344-221148, Fax: +91-4344-220520, Email: [kmpvel@yahoo.com](mailto:kmpvel@yahoo.com)

chimiques, le pH du liquide intestinal, qui représentent des barrières efficaces contre l'invasion par de nombreux micro-organismes. Cependant, quand les barrières physiques sont rompues, le corps induit la synthèse de protéines anti-microbiennes, principalement par le corps gras, dans les heures qui suivent une blessure. En général, l'immunité de l'insecte consiste en des réactions cellulaires et humorales. Les réactions cellulaires impliquent les phagocytes, la formation de nodules et l'encapsulation par les plasmotocytes et les granulocytes. Les réactions humorales impliquent l'activation de la cascade prophénol oxydase et l'induction de protéines immunitaires telles que les lysozymes, les lectines et les protéines antibactériennes et antifongiques.

Les insectes lépidoptères sont les cibles de virus, puisque le nombre d'espèces infestées est le double par comparaison à d'autres ordres d'insectes holométaboles (Martignoni et Iwai, 1986). On comprend mal le mécanisme par lequel l'insecte résiste aux infestations virales, reconnaît les cellules infestées et recrute des cellules immunitaires pour les foyers infectieux, ou élimine les cellules infestées (Popham et coll., 2004). Apparemment, les insectes n'ont pas de réponses immunitaires, fonctionnant de manière analogue aux réponses immunitaires adaptées des anticorps ou de l'histocompatibilité, des vertébrés (Hoffman, 2003).

L'apoptose ou la mort programmée des cellules est l'un des phénomènes mis au point par certains vertébrés et invertébrés comme mécanisme de défense antivirale (Narayanan, 2004). Ce mécanisme est un processus biochimique contrôlé, à distinguer de la nécrose de la cellule par des caractéristiques qui incluent le rétrécissement cellulaire, la formation de cloques sur la membrane, la condensation de la chromatine, la formation et la fragmentation de corps apoptotiques (Wyllie et coll., 1980). On a observé que les larves lépidoptères résistent à l'infestation par le baculovirus, par l'apoptose sélective des cellules infestées provenant des cellules épithéliales de l'intestin moyen et en se débarrassant des cellules infestées de l'intestin moyen. Cependant, très souvent, les virions entrent avec succès dans le corps de l'hôte, à l'aide du gène p35, qui agit comme un facteur anti-apoptose.

On a largement étudié PKR, une protéine kinase, activée par un ARN double brin. On sait que les niveaux accrus d'activité PKR induisent l'apoptose en réponse à des infestations virales, ce qui suggère donc le rôle positif de cette protéine dans l'induction de l'apoptose. Mais, le baculovirus a mis au point des mesures pour combatte le mécanisme de défense antivirale de l'hôte, en faisant la synthèse des protéines anti apoptotiques comme p35 et des inhibiteurs de l'apoptose (IAP), de manière à prévenir la mort des cellules induites par le mécanisme apoptotique de la cellule de l'insecte (Clem et coll., 1991, Prudhomme et Couble, 2002). La phénoloxydase est une enzyme très active, que l'on trouve à la fois chez les plantes et les invertébrés, puisqu'elle est responsable des réactions de mélanisation / d'encapsulation, que l'on observe couramment contre les micro-organismes et les parasites (Boman & Hultmark, 1987). Elle est habituellement stockée comme prophénoloxydase inactive et on peut l'activer par le peptidoglycane bactérien. Miranpuri et coll., (1992) ont observé une augmentation de l'activité de la phénoloxydase chez la sauterelle migratrice (*Melanoplus sanguinipes*) infestée par le virus.

### **Virus de la polyédrose nucléaire (BmNPV) et mode d'infestation :**

La polyédrose nucléaire (BmNPV) est une maladie virale redoutée du ver à soie. Le virus appartient à la famille des Baculoviridae des virus à ADN double brin enveloppés, qui infestent principalement les insectes lépidoptères. Les particules du virus sont incluses dans les occlusions protéiques, qui sont libérées dans l'intestin moyen par l'action du pH et des protéases alcalines de l'intestin. L'infestation commence quand l'enveloppe du virus fusionne avec la membrane microvillaire des cellules columnaires. Les cellules infestées de l'intestin moyen produisent des virions parsemés de glycoprotéines codées par le virus, ce qui est important pour l'infestation des tissus et des cellules avoisinantes de l'hôte (Monsama et coll., 1996). La température et l'humidité élevées associées aux mauvaises conditions sanitaires dominant sous les tropiques entraînent des pertes fréquentes en récoltes de cocons à cause des différentes maladies (Savanurmath et coll., 1995, Sivaprakasam et Rabindra, 1995, Subbarao et coll., 1991), dont les maladies virales représentent à



elles seules 33 % des pertes (Samson et coll., 1990). On a observé que les vers à soie bivoltins sont plus sensibles aux maladies virales que les lignées polyvoltines (Liu Shixian, 1984 ; Sivaprakasam et Rabindra, 1995). On peut supposer que le mécanisme de défense initial contre les pathogènes *per os* se trouve dans les tissus le long du tube digestif surtout dans le liquide digestif (Uchida et coll., 1984).

### Protéases intestinales du liquide digestif :

Les larves de lépidoptères présentent plusieurs spécialisations remarquables du tube digestif ; le transport épithélial le plus actif connu par les cellules en gobelet et les valeurs du pH les plus élevées pour être générées par un système biologique, protègent l'hôte des pathogènes envahissants. On a décrit plusieurs protéases de l'intestin moyen chez différentes espèces de Lépidoptères (Ishaaya et coll., 1971) ; Ahmad et coll., 1980 ; Pritchett et coll., 1981 ; Eguchi et Kuryama, 1985 ; Houseman et coll., 1989 ; Wolfson et Murdock, 1990 ; Christeller et coll., 1992 ; Purcell et coll., 1992). Les enzymes digestifs des insectes sont actifs à un pH extrêmement alcalin (10 - 12) que l'on observe dans l'intestin moyen (Dow, 1984). Cela diffère des enzymes digestifs des mammifères, tels que la trypsine bovine, qui a un pH optimum de 7,5 (Crewther, 1953) et commence à perdre son activité avec un pH > 10 (Wang et Carpenter, 1967). Toutes les protéases, caractérisées à la fois sous des formes d'homogénat brut et purifié, s'avèrent avoir un pH optimum de 10 à 11 ; Eguchi et Iwamoto et coll., 1976). On a montré que les enzymes protéolytiques chez de nombreux insectes et la plupart des protéases des insectes sont actives à un pH neutre ou alcalin (Day et Waterhouse, 1953 ; Gilmore 1961 ; Srivastava et Auclair, 1963 ; Pfldeirier & Zwilling 1966 ; Gooding et Huang, 1969).

Shinoda (1930) a rapporté le premier la présence de protéases intestinales chez le ver à soie, *Bombyx mori*, suivi par beaucoup d'autres (Horie et coll., 1963 ; Eguchi et Yoshitake, 1967 ; Hamano et Mukaiyama, 1970 ; Nishida et Hayashiya, 1974 ; Eguchi et Iwamoto, 1976). Les études réalisées sur les protéases de l'intestin moyen du sub-adulte de *B. mori* (Eguchi et coll., 1972 ; Eguchi et Iwamoto, 1975a) et d'*Antheraea pernyi* (Eguchi et Iwamoto, 1973) suggèrent leur utilisation comme source de l'enzyme de digestion du cocon. La nature des protéases de l'intestin moyen du sub-adulte et du tube digestif des larves de ver à soie diffèrent les unes des autres, compte tenu du pH plus élevé de 11,2 qui domine dans le tube digestif par comparaison au pH de l'enzyme du sub-adulte qui est de 9. De plus, on a rapporté que la protéase de l'intestin moyen et du liquide digestif augmente avec l'accroissement de l'alimentation du 1<sup>er</sup> au 5<sup>eme</sup> âge. On a analysé les changements de l'activité protéolytique dans l'intestin moyen et le contenu du liquide digestif chez le ver à soie. L'activité de l'enzyme disparaît au stade nymphal et atteint un sommet 1 ou 2 jours avant l'émergence (Eguchi et Iwamoto et coll., 1976). Watanabe et coll., (1990) ont trouvé beaucoup d'autres enzymes de l'intestin comme les sucraes, les cellulases et les phosphatases qui ont des propriétés antivirales.

On sait que le ver à soie, au 5<sup>eme</sup> âge larvaire, présente une forte activité protéolytique alcaline dans les tissus et dans le liquide digestif de l'intestin moyen (Eguchi et Iwamoto, 1976). Funakoshi et Aizawa (1989) ont décrit les caractéristiques des substances antivirales dans le liquide intestinal du ver à soie contre BmNPV. On a établi une corrélation entre l'activité alcaline de la protéase et une plus grande tolérance contre BmNPV (Datta et coll., 2000). Watanabe (1986) a observé une relation entre l'activité de la protéase et la réaction anti-NPV chez *B. mori* et il a suggéré que l'effet antiviral du liquide intestinal est dû à la protéase. Sen et et coll., (1996) ont étudié l'activité de la protéase alcaline chez cinquante lignées du ver à soie et leur sensibilité à BmNPV et ont trouvé une corrélation positive entre la part de l'activité de la protéase alcaline et la survie du ver à soie quand il est attaqué par le virus. Ponnuvel et coll., (1999) ont indiqué que la tolérance à l'infestation par BmNPV est positivement liée à l'activité de la protéase alcaline et que l'enzyme est plus active dans l'intestin moyen de la lignée de ver à soie tolérante. Suzuki (1936) a rapporté en premier la propriété antivirale inhibitrice du liquide digestif, ce qui a été plus tard confirmé par Aizawa, 1962, Aruga et Watanabe, 1964. Il a été établi que la protéine fluorescente rouge (RFP) (Hayashiya et coll., 1968, 1971, 1978)



et l'activité de la protéase alcaline dans le liquide intestinal du ver à soie présentent une activité antivirale (Funakoshi & Aizawa, 1989).

### **Protéines antivirales du liquide intestinal du ver à soie :**

#### **1. Rôle de la protéine fluorescente rouge dans l'immunité antivirale :**

Mukai et coll., (1969) ont été les premiers à rapporter qu'une protéine fluorescente rouge (RFP) dans le liquide digestif de *B. mori*, s'avère posséder une activité antivirale contre BmNPV (Hayashiya et coll., 1972). La séparation de la protéine précipitant le NPV de la RFP, sa purification et sa propriété d'inactivation du virus par la protéine purifiée ont été décrites (Uchida et coll., 1984). On a montré que la biosynthèse de la RFP *in vitro* se réalise à partir de 3 compartiments, une protéine de l'intestin moyen de la larve, la chlorophylle-a et une protéine du chloroplaste des feuilles vertes (Hayashiya et coll., 1976). On a suggéré que la RFP, qui est constituée de chlorophyllide-a tiré de la chlorophylle a, joue un rôle essentiel dans l'activité antivirale contre BmNPV (Hayashiya et coll., 1967a ; 1976b). On observe que la protéine lie le groupe prosthétic de la chlorophylle connu comme la protéine de liaison du chlorophyllide a (ChBP), une nouvelle catégorie de protéines de la famille des lipocalines, connue sous le nom de pentadecaline (Mauchamp et coll., 2006). Le gène ChBP de 45,5 kb est constitué de 46 exons. L'ADNc code une protéine de 2721 acides aminés. On a aussi purifié une RFP différente (65 kDA) ayant une activité antivirale contre BmNPV (Sethuraman et coll., 1993). Hou et Chiu (1986) ont émis l'hypothèse que la RFP contient plus d'une protéine de l'intestin moyen et on attribue l'activité antivirale de la RFP dans le liquide digestif du ver à soie à la phospholipase-C (PLC). Bien qu'on ne connaisse pas le mécanisme exact de l'action antivirale de la RFP, on pense qu'il détruit la nucléocapside du NPV, ou bloque la multiplication du NPV, ou agglutine le virus et qu'il est expulsé avec les excréments. Des efforts supplémentaires sont nécessaires pour connaître le mécanisme exact pour inhiber la multiplication de BmNPV et pour identifier les gènes responsables de la production de la RFP. Il faudrait aussi explorer les possibilités d'augmenter la production de RFP, soit naturellement ou en ajoutant des fortifiants avec les feuilles de mûrier (Yao et coll., 2006). Un essai dans cette direction ouvrirait des perspectives pour accroître la rentabilité et la durabilité de l'industrie séricicole (Jayaprakash et Rachappa, 2000). Les expériences révèlent que l'on ne détecte la RFP que dans le liquide digestif des larves nourries avec des feuilles de mûrier, mais qu'on ne la trouve pas dans le liquide des larves nourries sur aliment artificiel, sans poudre de feuille de mûrier. On observe que les larves de vers à soie, élevées de manière continue dans l'obscurité, sont plus sensibles à l'infestation perorale par NPV que celles élevées de manière continue dans un environnement avec de la lumière. L'augmentation de la sensibilité pourrait être due à l'absence ou à la production plus faible de RFP chez les larves élevées dans l'obscurité.

#### **2. Rôle des sérine protéases:**

Les protéases à sérine constituent une classe d'enzymes caractérisées par la présence d'une triade catalytique invariante constituée de trois acides aminés, c'est-à-dire His, Asp et Ser. Ces protéases à sérine jouent un rôle important dans la régulation des réponses d'immunité et de coagulation par clivage protéolytique et activation des produits successifs de ces voies métaboliques. Les protéases à sérine sont importantes dans les interactions avec les vecteurs de maladie des insectes et des parasites (Paskewitz et coll., 1999). Chez le ver à soie, on a rapporté deux types de protéases à sérine, à savoir, les protéases digestives et les protéases non digestives. Les protéases digestives à sérine du liquide digestif sont principalement impliquées dans la digestion de la nourriture et sont actives à un pH alcalin élevé. Les protéases non digestives sont un groupe de protéines disponibles dans l'hémolymphe, qui régulent plusieurs réponses de défense y compris la coagulation de l'hémolymphe, la synthèse des peptides antimicrobiens et la mélanisation des surfaces du pathogène et elles sont actives à un pH neutre (Goman et Paskewitz, 2001). On a isolé et purifié les protéases du liquide digestif du ver à soie et on a rapporté les caractères enzymatiques (Sasaki et Suzuki, 1982). Cette

revue se concentre principalement sur la protéase à sérine digestive, qui est aussi impliquée dans le mécanisme de défense antiviral

Dans le liquide digestif larvaire du ver à soie, la trypsine alkaliphilique comme la protéase à sérine existent, et présentent leur activité maximum à un pH de 10 (Sasaki et Suzuki, 1982). On a rapporté les séquences des acides aminés de la trypsine alkaliphilique du ver à soie et de la protéase à sérine dans le liquide digestif de la larve (Sasaki et coll., 1993). Kotani et coll., (1999) ont étudié les caractéristiques biochimiques, cloné et séquencé un ADNc pour la protéase. On a estimé l'activité alcaline de la protéase d'après la méthode de Eguchi et Iwamoto (1976) dans le liquide digestif de races de vers à soie tolérantes et sensibles à BmNPV. La zone de l'intestin moyen présente une activité maximum de la protéase alcaline par comparaison à l'intestin antérieur et à l'intestin postérieur (Ponnuvel et coll., 1999). De plus, on observe une augmentation de l'activité dans le liquide digestif de la lignée tolérante, par comparaison à la lignée sensible. Ces résultats sont en conformité avec les précédents travaux publiés et indiquent que l'activité de la protéase de l'intestin moyen joue un rôle important dans le mécanisme antiviral des vers à soie.

Nakazawa et coll., (2004) ont montré que la protéase à sérine dans le liquide digestif des larves de vers à soie a une forte activité antivirale contre BmNPV, que l'on a désignée en tant que BmSP-2. Ils ont rapporté qu'il pourrait y avoir cinq isoformes de la protéase à sérine y compris BmSP-2. La masse moléculaire de cette protéine est de 24271 Da. On a déterminé la séquence N-terminale en acides aminés de la protéine et on a cloné l'ADNc d'après cette séquence. Une recherche d'homologie de la séquence en acides aminés déduite de l'ADNc montre 84 % d'identité avec celle de *B. mandarina*. L'analyse de l'expression du gène de BmSP-2 montre que ce gène s'exprime dans l'intestin moyen mais pas dans d'autres tissus. De plus, le gène BmSP-2 ne s'exprime pas pendant les stades de mue et de vagabondage, ce qui indique que le gène est régulé de manière hormonale. Les résultats suggèrent que BmSP-2, une enzyme digestive de l'insecte, peut être un facteur antiviral potentiel contre BmNPV au site initial de l'infestation virale.

L'analyse phylogénétique en utilisant les programmes CLUSTALW et MEGA3 montre que la séquence de la protéase à sérine de *Bombyx* est fortement alignée avec les séquences en acides aminés de la protéase à sérine d'autres insectes lépidoptères, surtout avec celle de *B. mandarina*, un ancêtre du ver à soie domestiqué actuel. Les séquences de la protéase des insectes diptères se regroupent en un groupe unique, tandis que celles des insectes lépidoptères sont groupées à part (Fig. 1). Les résultats indiquent que les gènes de la protéase sont conservés, au travers des taxa d'insectes, ce qui suggère leur implication possible dans les réponses immunitaires. L'information pourrait être utile pour la mise au point de vers à soie résistants aux maladies par la transformation des gènes sauvages, hétérologues, de résistance à la maladie, à partir de genres plus étroitement apparentés, par lignage conventionnel ou par une approche biotechnologique. On a réalisé l'amplification PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène et on a amplifié les gènes chez toutes les races de vers à soie sélectionnés. Les produits PCR ont le même poids moléculaire, ce qui indique que les séquences des gènes sont très conservées à l'intérieur des races de vers à soie (Ponnuvel et coll., 2005).

### 3. Rôle des lipases dans l'activité antivirale :

On a purifié une protéine antivirale contre BmNPV du liquide digestif des larves de *B. mori* (Ponnuvel et coll., 2003). Une recherche d'homologie de séquence, déduite de l'ADNc à partir des acides aminés de la protéine de, révèle 56 % d'homologie avec la lipase de *Drosophila melanogaster* et 21 % d'homologie avec la lipase humaine. Comme l'activité de la lipase de la protéine a été confirmée *in vitro*, on désigne cette protéine Bmlipase1. L'analyse Northern blot montre que le gène de la Bmlipase-1 s'exprime dans l'intestin moyen mais pas dans d'autres tissus et il s'exprime de manière constitutive. Comme la protéase à sérine (Bm SP-2), la lipase ne s'exprime pas dans les stades de la mue. Les résultats suggèrent qu'une enzyme digestive de l'insecte a un potentiel comme barrière physiologique contre BmNPV au site initial de l'infestation virale.

On a analysé la présence de protéines antivirales dans les souches de germoplasmes. On a conçu les amorces spécifiques du gène des protéines antivirales comme la Bmlipase -1 et la Bmsérine (BmSp-2) et on a procédé à la réaction PCR en utilisant de l'ADN génomique comme matrice (Fig. 2). On a analysé le produit PCR amplifié dans de l'agarose et on a séquencé le fragment amplifié. Les séquences des gènes antiviraux varient, d'une race à l'autre, et l'analyse d'homologie de la séquence indique que les polyvoltins et les bivoltins se répartissent dans deux groupes séparés (Ponnuvel et coll., 2005). L'étude indique que le gène antiviral pourrait être probablement utilisé comme marqueur génétique pour caractériser les germoplasmes du ver à soie.

## CONCLUSION

On considère le virus de la polyédrose nucléaire (BmNPV) comme la maladie virale la plus redoutée dans l'industrie séricicole. La maladie provoque très souvent de très grandes pertes sur le plan économique. La maladie provoque des virions qui entrent habituellement, dans le tube digestif *per os* par la nourriture contaminée, où il rencontreront une défense du ver à soie. La température et l'humidité élevées des zones tropicales sont propices à la prolifération des polyèdres. Puisqu'on ne peut pas empêcher la maladie et lutter contre elle, la seule alternative consiste à utiliser des lignées résistantes à la maladie, pour obtenir des récoltes de cocons réussies sous les tropiques. Les scientifiques du monde entier travaillent de manière acharnée pour identifier le mécanisme génétique, qui sous-tend la tolérance à la maladie et le modèle d'hérédité des gènes, qui contrôlent la résistance. On peut adopter une stratégie de lignage efficace, en fonction du mécanisme génétique pour transmettre le caractère de résistance à la maladie chez les lignées de vers à soie productives qui, autrement, sont très sensibles. Des recherches importantes ont été réalisées sur l'immunité du ver à soie, cependant, on considère que le système immunitaire du ver à soie du mûrier est faible. Les rapports disponibles indiquent que le ver à soie possède un système immunitaire efficace contre les maladies virales. Les facteurs immunitaires du liquide digestif, tels que l'alcalinité élevée, l'activité de protéase élevée, la RFP, la Bmlipase -1, la protéase-2 de la Bmsérine pourraient agir comme des facteurs d'inhibition viraux contre le virus BmNPV. Cependant, la résistance virale est de nature polygénique. Il est donc nécessaire d'identifier les principaux facteurs qui contribuent à la résistance virale, pour pouvoir introduire ces facteurs chez les lignées sensibles, par un lignage conventionnel, ou par des approches biotechnologiques pour contribuer au développement plus important de l'industrie séricicole.



## DEVELOPMENT AND EVALUATION OF PARTHENOCLONES OF THE MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

D. GANGOPADHYAY & RAVINDRA SINGH

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

*An attempt was made to develop and evaluate parthenocloned of the silkworm, *Bombyx mori* L. in the laboratory. Induction of parthenogenetic development in the unfertilized egg batches was carried out by hot water treatment. Bivoltine silkworm breeds with sex-limited characteristics were kept as genetic marker to identify the parthenogenetic individuals. All the parthenogenetic individuals were exclusively females. Two parthenocloned P<sub>6</sub> and P<sub>7</sub> (marked larvae, dumbbell cocoons) were evaluated. The hybrid P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub> exhibited its superiority over the other hybrids. Application of artificial parthenogenesis in the development of outstanding silkworm breeds and hybrids would be advantageous in silkworm breeding to improve the efficiency of selection and to obtain uniform cocoons.*

**Keywords:** *Bombyx mori* L., development, evaluation, parthenocloned.

### INTRODUCTION

Artificial parthenogenesis has been extensively used in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. by means of diverse physico-chemical stimuli such as low temperature (Terskaya and Strunnikov, 1975), high temperature (Hirokawa, 1990; Ravindra Singh *et al.*, 1994; Gangopadhyay and Ravindra Singh, 2004), CO<sub>2</sub> (Qing *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1990) and laser beam (Xu *et al.*, 1995). Astaurov (1940) designed a suitable and reliable method of thermal parthenogenesis for activating silkworm eggs towards ameiotic parthenogenesis. Among various methods adopted, high temperature has been proved to be a powerful agent for induction of parthenogenetic development in silkworm (Astaurov, 1967). In silkworm, the heat shock applied to unfertilized eggs disrupts the metaphase I spindle and prevents reduction division giving rise to diploid female pronuclei identical to the mother's genotype (Strunnikov, 1975). The frequency of parthenogenesis is directly proportional to the heterozygosity of the individuals (Altukhov and Klimenko, 1978).

Strunnikov (1986) and Dznealaidze and Tabliashvili (1990) have observed marked stability of characters like viability, cocoon weight, cocoon shell weight and raw silk percentage in the hybrids developed through artificial parthenogenesis. Takei *et al.* (1990) have found improvement of selection efficiency whereas Strunnikov (1986) reported low phenotypic variability in F<sub>1</sub> hybrids comprising one of the parents as a parthenocloned. Ohkuma (1971) has studied mechanism of hybrid vigour through artificial parthenogenesis. Grenier *et al.* (2004) have explored the possibility of artificial parthenogenesis in the management of transgenic population of the silkworm. Petkov *et al.* (2005) have evaluated ameiotic parthenocloned for the creation of new F<sub>1</sub> hybrids. Recently, an attempt was made to improve the rate of hatchability in some parthenogenetic lines of the silkworm (Gangopadhyay and Ravindra Singh, 2006a). The present study was undertaken to evaluate two parthenocloned developed through artificial parthenogenesis of the silkworm, *B. mori* L. in the laboratory.

## MATERIALS AND METHODS

Induction of ameiotic parthenogenesis in the unfertilized eggs of the silkworm was carried out as per Astaurov (1940) and modified by Gangopadhyay and Ravindra Singh (2006b). Eggs were collected from ovarian tubules of female moths and washed in running tap water. Eggs were extracted by rubbing through a muslin sieve, dried and kept in a cotton bag for 12 h at room temperature. Then the eggs were dipped repeatedly 6 times in hot water at 46° C for 60 sec. and in cold water at 4 - 5 °C for 30 sec. After drying, egg batches were kept at 15 °C and 80 - 85 % relative humidity for 3 - 5 days. To terminate the egg diapause, eggs were treated in hot HCl (Specific gravity 1.075) at 46° C for 5 min. During egg incubation, care was taken to maintain the egg batches at room temperature (25 ± 1 °C) and higher relative humidity (90 - 95 %) till hatching. The parthenogenetic development of eggs was identified with the appearance of reddish-brown/dark pigmentation in the serosa cells. The ratio of reddish-brown/dark pigmented eggs and total number of eggs treated was expressed as percentage of parthenogenesis. Data were recorded for number of pigmented eggs, number of non-pigmented eggs, total number of eggs treated, parthenogenesis % and hatching %.

### Development of parthenocloners:

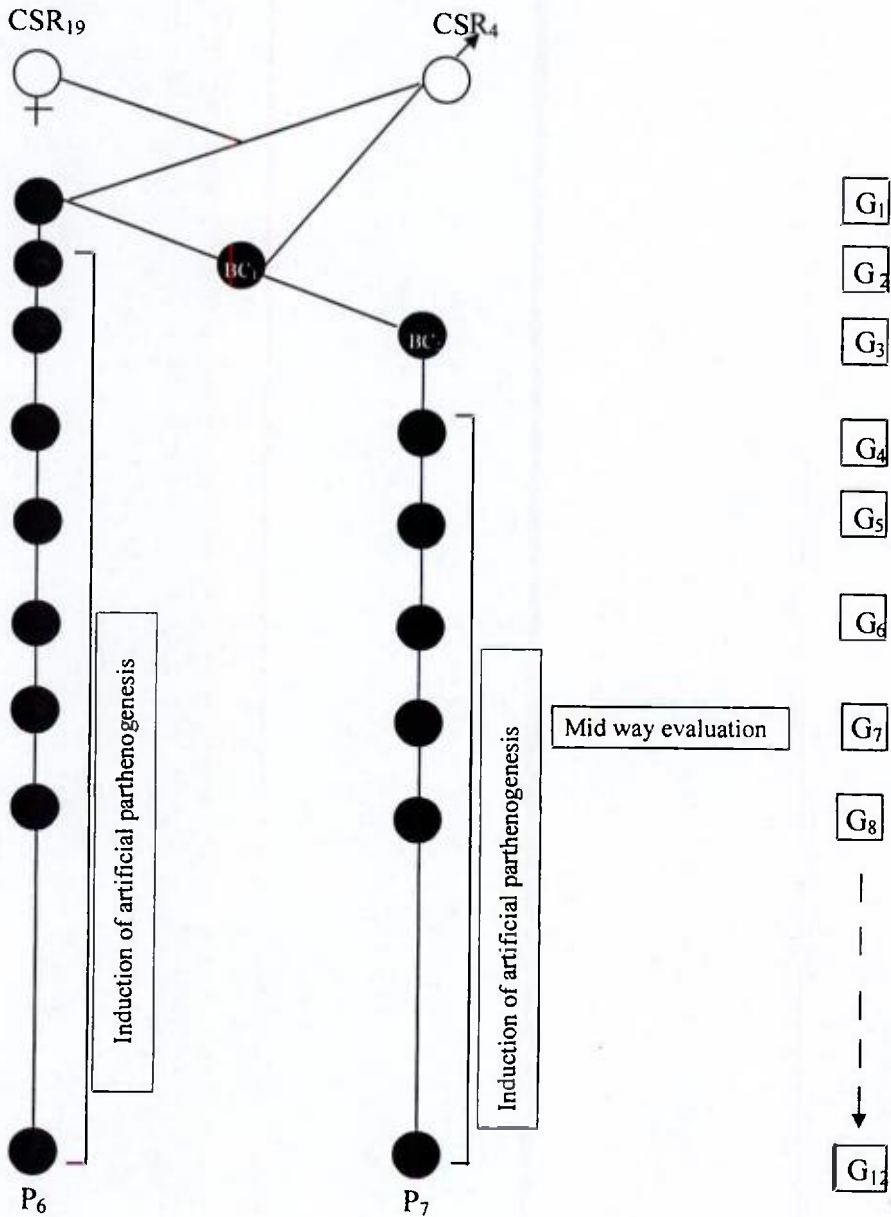
Two Japanese type bivoltine breeds *i. e.*, CSR<sub>19</sub> and CSR<sub>4</sub> were utilized as initial resource materials to raise the base population. The breeding plan has been depicted in Fig. 1. After 3<sup>rd</sup> moult, females were kept and separated on the basis of larval markings. Fifty cocoons with higher cocoon weight (> 1.700 g), cocoon shell weight (> 0.300 g) and cocoon shell percentage (> 17.50 %) were selected. Moths emerged from those cocoons were kept in a separate container. Eggs were collected from 30 virgin female moths and kept separately. The egg batch showing maximum parthenogenetic ability was retained. Rearing of larvae hatched from the parthenogenetic egg batch was carried out. P<sub>6</sub> of entirely females possessing same genotypical constitution of its mother was maintained generation-wise through continuous application of artificial parthenogenesis. Some of the parthenocloners of P<sub>6</sub> were backcrossed with CSR<sub>4</sub>. After 3<sup>rd</sup> moult, only 250 female larvae were kept and separated based on larval markings. Fifty good cocoons were selected based on higher cocoon weight (> 1.400 g), cocoon shell weight (> 0.250 g) and cocoon shell percentage (> 17.00 %). Eggs were collected from 30 virgin female moths. Artificial parthenogenesis was applied to know the level of parthenogenetic development in each egg batch. One egg batch showing maximum parthenogenetic development and hatchability was retained. The parthenocloners were backcrossed with CSR<sub>4</sub> and artificial parthenogenesis was applied at every generation and designated as P<sub>7</sub>.

### Evaluation of parthenocloners:

Four bivoltine hybrids *i. e.*, P<sub>6</sub> × DNB<sub>1</sub>, P<sub>6</sub> × CSR<sub>2</sub>, P<sub>7</sub> × DNB<sub>1</sub> and P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub> were short listed and evaluated. Performance of the hybrids was compared statistically with the control CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub> in the laboratory. Evaluation of the hybrids has been carried out through multiple traits evaluation index method of Mano *et al.* (1993). To know the variability in cocoon size, one hundred F<sub>1</sub> hybrid cocoons were randomly picked up and three cocoon size variables *i. e.*, cocoon length, cocoon width and length / width ratio were determined. The salient features of bivoltine silkworm breeds and hybrids are furnished in Table I.

## RESULTS

Generation-wise performance of P<sub>6</sub> and P<sub>7</sub> for 11 characters namely, parthenogenesis percentage, hatching percentage, pupation rate, yield / 10,000 larvae by weight, cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell percentage including post cocoon parameters like filament length, reelability, raw silk percentage and neatness has been presented in Table II and III respectively.



**Fig. 1. Breeding plan of P6 and P7.**  
**Fig. 1. Plan de breeding de P6 et de P7.**



Table I. Salient features of bivoltine parthenoclones and hybrids of the silkworm, *B. mori* L.Tableau I. Caractéristiques majeures des parthénoclones et des hybrides bivoltins du ver à soie, *B. mori* L.

Parthenoclone / Hybrid	Parents involved	Method adopted	Sex	Egg		Larval pattern	Cocoon	
				Colour	Shape		Colour	Shape
Parthénoclone / Hybride	Parents impliqués	Méthode adoptée	Sexe	Oeuf		Motif de la larve	Cocon	
				Couleur	Forme		Couleur	Forme
P <sub>6</sub>	CSR <sub>19</sub> × CSR <sub>4</sub>	Artificial parthenogenesis	Parthenoclones with entirely females	Yellowish -white	Oval	Females- Marked bluish white	Creamish White	Dumbbell
			Parthénogénèse artificielle avec entièrement des femelles	Blanc jaunâtre	Ovale	Femelles - Marques d'un blanc bleuâtre	Blanc crémeux	Cintrée
P <sub>7</sub>	Parthenoclones of CSR <sub>19</sub> × CSR <sub>4</sub> backcrossed with CSR <sub>4</sub>	Artificial parthenogenesis coupled with conventional breeding	Parthenoclones with entirely females	Yellowish -white	Oval	Females- Marked bluish white	White	Dumbbell
			Parthénoclones de CSR <sub>19</sub> × CSR <sub>4</sub> en retrocroisement avec CSR <sub>4</sub>	Parthénogénèse artificielle associée à un breeding conventionnel	Blanc jaunâtre	Ovale	Femelles - Marques d'un blanc bleuâtre	Blanc
P <sub>7</sub> × CSR <sub>2</sub>	-	-	Bisexual Bisexuel	Yellowish-white Blanc jaunâtre	Oval Ovale	-	White Blanc	Intermediate between oval and dumbbell Intermédiaire entre ovale et cintrée

Table II. Performance of bivoltine parthenoclone P<sub>6</sub>.Tableau II. Performance du parthénoclone bivoltin P<sub>6</sub>.

Generation	Partheno- genesis	Hatching	Pupation rate	Yield/10000 larvae by wt.	Cocoon wt.	Cocoon shell wt.	Cocoon shell	Filament length	Reel- ability	Raw silk	Neat- ness
	<i>Parthéno- genèse</i>	<i>Eclosion</i>	<i>Taux de nymphe</i>	<i>Rendement / 10 000 larves en poids (kg)</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque soyeuse</i>	<i>Coque soyeuse</i>	<i>Longueur du filament</i>	<i>Dévida- bilité</i>	<i>Soie grège</i>	<i>Netteté</i>
	(%)	(%)	(%)	(kg)	(g)	(g)	(%)	(m)	(%)	(%)	(p)
G <sub>1</sub>	88.56	78.13	86.13	15.200	1.781	0.326	18.30	767	84.6	13.26	91
G <sub>2</sub>	63.18	48.03	80.33	12.362	1.547	0.281	18.16	730	84.4	13.60	90
G <sub>3</sub>	72.81	46.88	86.93	13.230	1.525	0.303	19.87	725	83.6	14.86	90
G <sub>4</sub>	88.56	33.92	88.67	13.033	1.567	0.311	19.85	750	84.5	15.16	91
G <sub>5</sub>	93.82	54.92	89.97	13.280	1.684	0.328	19.48	721	83.9	14.43	90
G <sub>6</sub>	85.00	48.64	90.13	17.000	1.893	0.370	19.55	800	86.4	15.31	91
G <sub>7</sub>	95.08	76.36	82.00	15.627	1.973	0.380	19.26	835	82.7	13.98	91
G <sub>8</sub>	90.69	73.39	95.17	16.217	1.713	0.340	19.85	813	80.0	14.40	91
G <sub>9</sub>	91.29	75.69	93.07	14.240	1.539	0.302	19.62	800	83.0	15.13	92
G <sub>10</sub>	94.30	74.25	94.27	15.920	1.718	0.338	19.67	865	82.0	15.23	92
G <sub>11</sub>	95.47	75.77	97.33	16.667	1.712	0.338	19.74	857	81.3	15.13	91
G <sub>12</sub>	96.22	77.04	95.33	16.880	1.779	0.345	19.39	864	79.7	15.37	92
Mean / Moyenne	87.92	63.59	89.94	14.971	1.703	0.330	19.40	794	83.0	14.66	91

Table III. Performance of bivoltine parthenoclone P7.

Tableau III. Performance du parthénoclone bivoltin P7.

Generation	Partheno- genesis	Hatching	Pupation rate	Yield/10000 larvae by wt.	Cocoon wt.	Cocoon shell wt.	Cocoon shell	Filament length	Reel- ability	Raw silk	Neat- ness
	<i>Parthéno- genèse</i>	<i>Eclosion</i>	<i>Taux de nymphe</i>	<i>Rendement / 10 000 larves en poids (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque soyeuse (g)</i>	<i>Coque soyeuse (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Dévida- bilité (%)</i>	<i>Soie grège (%)</i>	<i>Netteté (p)</i>
	(%)	(%)	(%)	(kg)	(g)	(g)	(%)	(m)	(%)	(%)	(p)
G <sub>1</sub>	88.56	78.13	86.13	15.200	1.781	0.326	18.30	767	84.6	13.26	91
G <sub>2</sub>	54.93	23.22	86.60	16.419	1.919	0.371	19.33	861	83.6	13.88	90
G <sub>3</sub>	50.37	21.67	87.67	16.352	1.870	0.385	20.59	797	82.6	15.07	93
G <sub>4</sub>	62.96	36.01	84.44	12.362	1.488	0.291	19.56	731	80.5	15.09	90
G <sub>5</sub>	88.05	42.07	85.78	13.422	1.577	0.298	18.90	710	80.8	14.50	91
G <sub>6</sub>	80.05	39.93	81.66	14.438	1.792	0.333	18.58	776	82.2	14.10	90
G <sub>7</sub>	87.26	47.44	83.20	14.680	1.860	0.341	18.33	771	83.5	13.71	91
G <sub>8</sub>	91.36	77.69	94.67	14.400	1.594	0.304	19.07	811	83.0	15.43	92
G <sub>9</sub>	92.08	73.55	90.67	13.840	1.524	0.278	18.24	774	83.7	14.27	92
G <sub>10</sub>	94.81	71.60	93.73	15.467	1.594	0.309	19.39	744	81.3	15.03	93
G <sub>11</sub>	94.78	72.30	96.67	15.387	1.584	0.294	18.56	777	80.0	14.40	92
G <sub>12</sub>	95.82	76.39	93.47	15.627	1.699	0.324	19.07	814	79.7	14.27	90
Mean / Moyenne	81.75	55.00	88.72	14.800	1.690	0.321	18.99	778	82.1	14.42	91



Table IV. Performance of short listed bivoltine hybrids in the laboratory.

Tableau IV. Performance des hybrides bivoltins sélectionnés en laboratoire.

Hybrids	Fecundity	Hatching	Pupation	Yield /10000 larvae by wt.	Cocoon wt.	Cocoon shell wt.	Cocoon shell	Filament length	Reel-ability	Raw silk	Neatness	Avg. E. I. value †	Cocoon size uniformity ††
Hybrides	Fécondité	Ecllosion	Nymphose	Rendement /10 000 larves en poids (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque soyeuse (g)	Coque soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	Dévi-dabilité (%)	Soie grège (%)	Netteté (p)	Valeur E. I. moyenne †	Régularité du titre du cocon ††
	(no)	(%)	(%)										
P <sub>6</sub> × DNB <sub>1</sub>	534** (-0.19)	98* (0.00)	97.6 ** (1.24)	17.07** (-0.58)	1.775 (0.57)	0.378** (2.44)	21.27** (1.62)	1012** (2.12)	82.0* (0.00)	17.6** (6.02)	91** (0.00)	52.4	166.81±6.85
P <sub>6</sub> × CSR <sub>2</sub>	557** (4.11)	99** (1.02)	95.1** (-1.35)	16.96** (-1.22)	1.787 (1.25)	0.386** (4.61)	21.62** (3.30)	993** (0.20)	80.7 (-1.59)	17.5** (5.42)	88 (-3.30)	50.1	169.79±7.01
P <sub>7</sub> × DNB <sub>1</sub>	535** (0.00)	97 (-1.02)	97.1** (0.73)	17.23** (0.35)	1.809* (2.49)	0.394** (6.78)	21.78** (4.06)	1015** (2.42)	82.0* (0.00)	17.6** (6.02)	92** (1.10)	54.3	165.48±7.07
P <sub>7</sub> × CSR <sub>2</sub>	536** (0.19)	97 (-1.02)	96.4** (0.00)	17.76** (3.44)	1.880** (6.52)	0.411** (11.38)	21.85** (4.40)	1077** (8.68)	82.0* (0.00)	17.8** (7.23)	92** (1.10)	57.5	163.56±6.92
CSR <sub>19</sub> × CSR <sub>4</sub> (Control / Témoin)	445	96	92.5	15.88	1.728	0.350	20.25	846	80.6	15.0	89	35.7	185.91±8.73
CD@5%	19	1.0	1.4	0.23	0.074	0.014	0.59	33	1.2	0.41	0.9	-	-
CD@1%	28	1.5	2.0	0.34	0.108	0.020	0.85	48	1.7	0.60	1.3	-	-
SE ±	5.97	0.32	0.43	0.07	0.02	0.004	0.18	10.22	0.36	0.13	0.27	-	-

† Avg. E. I. value indicates the average evaluation indices / La valeur E. I. moyenne indique les indices d'évaluation moyens.

†† Cocoon size uniformity indicates mean of cocoon length / width ratio ± SD of 100 cocoons. / La régularité du titre du cocon indique le ratio moyen longueur / largeur du cocon ± l'écart type de 100 cocons.

\* and \*\* denote significant difference at 5% and 1% level respectively from the original control hybrid CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub>; \* et \*\* indiquent la différence significative aux seuils de respectivement 5 % et 1 % par rapport à l'hybride témoin d'origine CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub>.

Values in parentheses are per cent improvement over the ruling hybrid CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub>. / Les valeurs entre parenthèses sont le % d'amélioration par rapport à l'hybride habituel CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub>.

**Performance of P<sub>6</sub>:**

At F<sub>1</sub>, 30 virgin female moths of the hybrid CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub> were collected. Eggs extracted individually from each female were kept separately. Artificial parthenogenesis was induced in each egg batch. A distinct variation was observed among the different egg batches. Parthenogenetic development varied from 80.78 - 98.40 % with an average of 88.56 %. Hatchability varied from 61.49 - 86.38 % with an average of 78.13 %. One egg batch showing maximum rate of parthenogenetic development (98.40 %) and hatchability (86.38 %) was retained and 425 larvae hatched from those eggs. All the G<sub>1</sub> parthenogenetic individuals were exclusively females. From G<sub>1</sub> onwards, eggs were extracted collectively from 10 – 15 virgin female moths and brushed in mass.

**Performance of P<sub>7</sub>:**

G<sub>1</sub> parthenocloned of P<sub>6</sub> were backcrossed with CSR<sub>4</sub>. At G<sub>2</sub>, 30 female virgin moths collected and eggs were extracted individually from each female. Parthenogenetic development varied from 39.61 - 62.83 % with an average of 54.93 %. Out of 30, only 27 egg batches showed hatchability, which varied from 17.46 - 46.55 % with an average of 23.22 %. The egg batch showing maximum rate of parthenogenetic development (62.83 %) and hatching (46.55 %) was retained and 155 larvae hatched from those eggs. All the parthenogenetic individuals were exclusively females.

**Performance of bivoltine hybrids in the laboratory:**

Four hybrids *i. e.*, P<sub>6</sub> × DNB<sub>1</sub>, P<sub>6</sub> × CSR<sub>2</sub>, P<sub>7</sub> × DNB<sub>1</sub> and P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub> were evaluated in the laboratory. Performance of the hybrids was statistically compared with the original hybrid CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub> taken as control. Comparative performance of the hybrids along with CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub> has been presented in Table IV. All the hybrids exhibited their superiority for at least 8 out of 11 characters. Two hybrids namely, P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub> and P<sub>7</sub> × DNB<sub>1</sub> showed higher average evaluation index values of 57.5 and 54.3 respectively. Highly significant ( $p < 0.01$ ) increase for 9 characters *i. e.*, fecundity (536), pupation rate (96.4 %), yield / 10,000 larvae (17.76 kg), cocoon weight (1.880 g), cocoon shell weight (0.411 g), cocoon shell percentage (21.85 %), filament length (1077 m), raw silk percentage (17.8 %) and neatness (92) was recorded in P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub>. Per cent improvement of those hybrids compared to the ruling one CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub> has been calculated. Higher per cent improvement for 4 characters *i. e.*, cocoon weight (6.52 %), cocoon shell weight (11.38 %), filament length (8.68 %) and raw silk percentage (7.23 %) was observed in P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub>. Cocoon length / width ratio was calculated to know the variability in cocoon size. Though, cocoon size uniformity test revealed less variability in all the hybrid cocoons possessing standard deviation less than 8, cocoons of two hybrids namely, P<sub>6</sub> × DNB<sub>1</sub> (166.81 ± 6.85) and P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub> (163.56 ± 6.92) were found comparatively uniform.

**DISCUSSION**

Development of silkworm breeds by conventional breeding has played significant role in upgrading both quality and quantity of silk produced (Datta, 1984). Since most of the quantitative characters in silkworm are governed by polygenes, their inheritance shows variation and therefore, more emphasis is being paid for selection of silkworm breeds based on their phenotypic expression (Nagaraju, 1998). Sometimes, a suitable phenotype may not exhibit a suitable genotype and due to low heritability, the subsequent progeny may lose its unique genotype. It is desirable to preserve the exact genotypical copy of the parent in the descendants (Strunnikov, 1983). Parthenogenesis in the mulberry silkworm has been reviewed by many workers (Strunnikov, 1975; Choudhury, 1989; Ravindra Singh *et al.*, 1997; Klimenko, 2001; Gangopadhyay *et al.*, 2005).

In the present study, two promising silkworm parthenocloned *i. e.*, P<sub>6</sub> and P<sub>7</sub> have been developed and evaluated.

Adoption of backcrossing was made to improve the commercial characters in the parthenoclones. Artificial parthenogenesis has been utilized to obtain genetically stabilized breeds and proved to be highly useful as breeding lines with restored diploidy of lower inbreeding depression without reduction in quantitative characters (Astaurov, 1957; Retnakaran and Percy, 1985). Performance of the hybrids *i. e.*,  $P_6 \times DNB_1$ ,  $P_6 \times CSR_2$ ,  $P_7 \times DNB_1$  and  $P_7 \times CSR_2$  was statistically compared with the original hybrid  $CSR_{19} \times CSR_4$  taken as control. The hybrid  $P_7 \times CSR_2$  was found promising. Selection based on multiple traits to judge superiority of the silkworm was impartially adopted to evaluate desirable silkworm hybrids (Singh and Subba Rao, 1993; Narayanaswamy *et al.*, 2002; Maqbool *et al.*, 2005). Ravindra Singh *et al.* (1998) have studied the cocoon size uniformity in silkworm. Suitability of these hybrids has been assessed through cocoon size uniformity. All the hybrids exhibited uniformity in cocoon size with intermediate in shape between dumbbell and oval possessing standard deviation less than 8. Similar observation has been reported in the hybrids developed through artificial parthenogenesis (Ravindra Singh *et al.*, 2004).

$P_7 \times CSR_2$  was selected and further evaluated in the laboratory. Laboratory performance showed superiority of  $P_7 \times CSR_2$  over the control  $CSR_{19} \times CSR_4$ . Artificial parthenogenesis facilitates to transform a single highly heterotic genotype into different genotypical variants with varying degree of heterozygosity between useful and harmful genes (Strunnikov, 1986). Strunnikov (1995) has observed 30% more silk in a hybrid comprising parthenoclone-43 as a component having egg viability of 80 - 90%, larval viability of 90 - 95%, cocoon weight of 2.0 - 2.4 g, filament length of 1,300 m and silk productivity of 23.0 - 24.5%. Aneiotic parthenoclones have been utilized for the creation of new  $F_1$  hybrids for industrial cocoon production (Petkov *et al.*, 2005). The breeds developed through the application of artificial parthenogenesis may be used as breeding resource materials for the development of superior silkworm breeds to obtain genetically identical copies of silkworm. In the present study, cocoons of  $F_1$  hybrids between  $P_6/P_7$  and bivoltine breeds exhibited less phenotypic variability. Further studies are required to know the level of homozygosity of the parthenoclones through DNA fingerprinting.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the Department of Science and Technology, New Delhi for financial assistance and the Director, CSRTI, Mysore for providing necessary facilities.

### REFERENCES

- ALTUKHOV Y. P. & KLIMENKO V. V. (1978) Positive correlation between the level of individual heterozygosity and the ability to complete thermal parthenogenesis in the silkworm. Doklady Akademii Nauk SSSR (USSR), 239, 460-462.
- ASTAUROV, B. L. (1940) Artificial parthenogenesis in the silkworm (*Bombyx mori* L.) (Experimental study). Accademia delle Scienze Dell'urss. pp. 221-240.
- ASTAUROV B. L. (1957) High temperature as a tool for controlling development and sex determination: A review of studies in artificial parthenogenesis, androgenesis and elimination of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori* L. Proc. Zool. Soc. Calcutta, Mookerjee Memoir., 1, 29-56.
- ASTAUROV, B. L. (1967) Experimental alterations of the developmental cytogenetic mechanisms in mulberry silkworm: Artificial parthenogenesis, polyploidy, gynogenesis and androgenesis. Adv. Morphogen., 6, 199-257.
- CHOWDHURY S. N. (1989) Parthenogenesis, gynogenesis and androgenesis in silkworm, *Bombyx mori*: A review. Indian J. Seric., 28 (2), 284-292.
- DATTA R. K. (1984) Improvement of silkworm races (*Bombyx mori* L.) in India. Sericologia, 24 (3), 393-415.



- DZNEALAI DZE A. N. & TABLIASHVILI T. S. I. (1990) Cloned hybrid lines of the silkworm, *Shelk*, 4, 7-8.
- GANGOPADHYAY D. & RAVINDRA SINGH (2006a) Improvement of parthenogenetic development in the eggs of some parthenogenetic lines of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Entomon*, 31 (1), 9-14.
- GANGOPADHYAY D. & RAVINDRA SINGH (2006b) An improved method of parthenogenetic development and analysis of combining ability in bivoltine breeds of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Int. J. Indust. Entomol.*, 13 (2), 63-72.
- GANGOPADHYAY D. & RAVINDRA SINGH (2004) Preliminary report on parthenogenetic development in excised unfertilized eggs of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 43 (2), 210-212.
- GANGOPADHYAY D., RAVINDRA SINGH, KARIAPPA B. K. & DANDIN, S. B. (2005) Parthenogenesis in silkworm, *Bombyx mori* L. *Int. J. Indust. Entomol.*, 10 (1), 1-10.
- GRENIER A. -M., ROCHA M. D., JALABERT A. ROYER C., MAUCHAMP B. & CHAVANCY G. (2004) Artificial parthenogenesis and control of voltinism to manage transgenic populations in *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol.*, 50 (8), 751-760.
- HIROKAWA M. (1990) Selection of the high parthenogenetic lines and examinations of their practical characters in commercial F1 hybrid races of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bull. Fukushima Seric. Exp. Stn.*, 24, 1-6.
- KLIMENKO V. V. (2001) Parthenogenesis and cloning in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Problems and Prospects. J. Insect Biotech. Seric.*, 70 (3), 155-165.
- MANO Y., NIRMAL KUMAR S., BASAVARAJA, H. K., MAL REDDY, N. & DATTA, R. K. (1993) A new method to select promising silkworm breeds / combinations. *Indian Silk*, 31, 53.
- MAQBOOL A., MALIK G. N., DAR H. U., KAMILI S. A. & ZAFFAR G. (2005) Evaluation of some bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) genotypes under different seasons. *Indian J. Seric.*, 44 (2), 147-155.
- NAGARAJU J. (1998) Silk yield attributes – correlations and complexities. In: *Silkworm Breeding*, Sreerama Reddy, G. (Ed.), pp.168-185, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi.
- NARAYANASWAMY T. K., GOVINDAN R. & ANANTHANARAYANA S. R. (2002) Selection of multivoltine × bivoltine cross breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. through evaluation indices. *Indian J. Seric.*, 41 (2), 176-178.
- OHKUMA T. (1971) Studies on the mechanism of hybrid vigour by means of artificial parthenogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 40, 422-430.
- PETKOV N., VASILEVA Y., NATCHEVA Y., PETKOV Z., GREISS H., GALANEVA O., SAFONOVA T. & LIJAHENKO Y. (2005) Complex evaluation of silkworm *Bombyx mori* L. ameiotic parthenoclonal lines. *Bulgarian J. Agric. Sci.*, 11 (3): 353-356.
- QING I., WABE S. & SAKAGUCHI B. (1988) Induction of androgenesis, gynogenesis and mosaicism by treatment with CO<sub>2</sub> gas derived from dry ice. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 51 (1), 43-48.
- RAVINDRA SINGH, AHSAN M. M. & DATTA R. K. (1997) Artificial parthenogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* L.: A review. *Indian J. Seric.*, 36 (2), 87-91.
- RAVINDRA SINGH, JAYASWAL K. P. & SARATCHANDRA B. (1994) Parthenogenetic development of ovarian eggs in some breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. *Entomon*, 19 (1&2), 57-62.
- RAVINDRA SINGH, KALPANA G. V., SUDHAKARA RAO P. & AHSAN M. M. (1998) Studies on cocoon shapes in different crosses of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 37 (1), 85-88.
- RAVINDRA SINGH, RAO D. R., GANGOPADHYAY D., CHOUDHARY N., KARIAPPA B. K. & DANDIN S. B. (2004) Development of a polyvoltine breed- BL<sub>67</sub> (Pg) of the silkworm, *Bombyx mori* L. with parthenogenetic origin. *Int. J. Indust. Entomol.*, 9 (1), 41-46.
- RETNAKARAN A. & PERCY J. (1985) Fertilization and special modes of reproduction. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut G. A. and Gilbert, L. I. (Eds.), Vol. 1, pp. 242-253, Pergamon Press, New York.

- SINGH T. & SUBBA RAO G. (1993) Multiple traits evaluation index to screen useful silkworm (*Bombyx mori*) hybrid genotypes. *Gior. Ital. Entomol.*, 6, 379-382.
- STRUNNIKOV V. A. (1975) Sex control in silkworms. *Nature*, 255, 111-113.
- STRUNNIKOV V. A. (1983) Control of silkworm reproduction, development and sex. pp. 1-280, Mir Publishers, Moscow.
- STRUNNIKOV V. A. (1986) Nature of heterosis and combining ability in the silkworm. *Theor. Appl. Genet.*, 72 (5), 503-512.
- STRUNNIKOV V. A. (1995) Control over reproduction, sex and heterosis of the silkworm. pp. 1-343, Harwood Academic publishers, Moscow.
- TAKEI R., NAKAGAKI M., KODAIRA R. & NAGASHIMA E. (1990) Factor analysis on the parthenogenetic development of ovarian eggs in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 25 (1), 43-48.
- TERSKAYA E. R. & STRUNNIKOV V. A. (1975) Artificial meiotic parthenogenesis in mulberry silkworm. *Genetika*, 11 (3), 54-67.
- XU H. R., CHENG Z. Y., SUN W. H. & LAU X. G. (1990) Preliminary report on the induction of silkworm parthenogenesis by laser beam. *Canye Kexue*, 16 (4), 236-237.
- XU H. R., WU C. C., CHEN Z. G. & CHEN X. G. (1995) The induction of silkworm by CO<sub>2</sub> laser irradiation. *Hereditas*, 17 (1), 12-15.

## MISE AU POINT ET EVALUATION DE PARTHENOCLONES CHEZ LE VER A SOIE DU MURIER, *BOMBYX MORI L.*

D. GANGOPADHYAY & RAVINDRA SINGH

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

*Nous avons essayé de mettre au point et d'évaluer des parthénoclonés du ver à soie, **Bombyx mori L.** en laboratoire. On procède à l'induction du développement parthénogénétique chez les lots d'œufs non fécondés par traitement avec de l'eau chaude. On conserve les lignées de vers à soie bivoltins aux caractéristiques limitées au sexe, comme marqueur génétique, pour identifier les individus parthénogénétiques. Tous les individus parthénogénétiques sont exclusivement des femelles. On évalue deux parthénoclonés P6 et P7 (larves marquées, cocons cintrés). L'hybride P7 × CSR2 montre sa supériorité par rapport aux autres hybrides. L'application de la parthénogénèse artificielle dans la mise au point de lignées et hybrides de vers à soie remarquables présenterait des avantages dans le lignage du ver à soie pour améliorer l'efficacité de la sélection et pour obtenir des cocons uniformes.*

### INTRODUCTION

On a beaucoup utilisé la parthénogénèse artificielle chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori L.* aux moyens de différents stimuli physico-chimiques tels que la basse température (Terskaya et Strunnikov, 1975), la température élevée (Hirokawa, 1990 ; Ravindra Singh et coll., 1994 ; Gangopadhyay et Ravindra Singh, 2004), le CO<sub>2</sub> (Qing et coll., 1988 ; Xu et coll., 1990) et le rayon laser (Xu et coll., 1995). Astaurov (1940) a conçu une méthode adaptée et fiable de parthénogénèse pour activer les œufs de vers à soie vers la parthénogénèse améiotique. Parmi les diverses méthodes adoptées, la température élevée s'avère être un agent puissant pour l'induction du développement parthénogénétique chez le ver à soie (Astaurov, 1967). Chez le ver à soie, l'application de choc thermique aux œufs non fécondés dérange le fuseau de la métaphase I et empêche la division réductionnelle, ce qui donne naissance à des pronuclei femelles diploïdes identiques au génotype de la mère (Strunnikov, 1975). La fréquence de la parthénogénèse est directement proportionnelle à l'hétérozygotie des individus (Altukhov et Klimenko, 1978).

Strunnikov (1986) et Dznealaidze et Tabliashvili (1990) ont observé une stabilité marquée des caractères comme la viabilité, le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse et le pourcentage de soie grège chez les hybrides mis au point par parthénogénèse artificielle. Takei et coll., (1990) ont constaté une amélioration de l'efficacité de la sélection tandis que Strunnikov (1986) a rapporté une faible variabilité phénotypique chez les hybrides F1, comprenant un parthénocloné comme un des parents. Ohkuma (1971) a étudié le mécanisme de la vigueur hybride par la parthénogénèse artificielle. Grenier et coll., (2004) ont exploré la possibilité d'utiliser la parthénogénèse artificielle dans la gestion d'une population transgénique du ver à soie. Petkov et coll., (2005) ont évalué les parthénoclonés améiotiques pour la création de nouveaux hybrides F1. Récemment, on a essayé d'améliorer le taux d'éclosion chez certaines lignées parthénogénétiques du ver à soie (Gangopadhyay et Ravindra Singh, 2006a). Cette étude a été entreprise pour évaluer deux parthénoclonés du ver à soie *B. mori L.*, mis au point par parthénogénèse artificielle en laboratoire.



## MATERIELS ET METHODES

Asturov (1940) a réalisé l'induction de la parthénogenèse améiotique chez les œufs non fécondés du ver à soie et Gangopadhyay et Ravindra Singh (2006b) l'ont modifiée. On recueille les œufs des tubes ovariens des papillons femelles et on les lave sous l'eau du robinet. On extrait les œufs en les frottant dans un tamis en mousseline, on les sèche et on les conserve dans un sac en coton pendant 12 h à température ambiante. Puis on trempe les œufs de manière répétée, 6 fois, dans de l'eau chaude à 46° C pendant 60 sec. et dans de l'eau froide à 4 - 5° C pendant 30 sec. Après les avoir séchés, on conserve les lots d'œufs à 15°C avec 80 à 85 % d'humidité relative pendant 3 à 5 jours. Pour lever la diapause de l'œuf, on traite les œufs dans de l'HCl chaud (densité de 1,075) à 46° C pendant 5 min. Pendant l'incubation des œufs, on fait attention de maintenir les lots d'œufs à température ambiante (25 ± 1° C) et à une humidité relative plus élevée (90 à 95 %) jusqu'à l'éclosion. On identifie le développement parthénogénétique des œufs avec l'apparition d'une pigmentation brune foncée dans les cellules de la séreuse. On exprime le ratio d'œufs pigmentés brune foncée par rapport au nombre total d'œufs traités comme le pourcentage de parthénogenèse. On enregistre les données par rapport au nombre d'œufs pigmentés, au nombre d'œufs non pigmentés, au nombre total d'œufs traités, au % de parthénogenèse et au % d'éclosion.

### Mise au point des parthénoclones :

On utilise deux lignées bivoltines de type Japonais, c'est-à-dire CSR<sub>19</sub> et CSR<sub>4</sub> comme matériaux initiaux pour élever la population de base. Le plan de breeding est présenté dans la Fig. 1. Après la 3<sup>ème</sup> mue, on conserve et on sépare les femelles sur la base des marquages larvaires. On sélectionne cinquante cocons au poids du cocon (> 1,700 g), au poids de la coque soyeuse (> 0,300 g) et à la richesse soyeuse (> 17,50 %) supérieurs. On conserve les papillons ayant émergé de ces cocons dans un récipient séparé. On recueille les œufs de 30 papillons femelles vierges et on les conserve séparément. On retient le lot d'œufs présentant la capacité parthénogénétique maximum. On procède à l'élevage des larves écloses à partir du lot d'œufs parthénogénétiques. On maintient P<sub>6</sub>, constitué entièrement de femelles possédant entièrement la même constitution génotypique que la mère, en fonction des générations, par l'application continue de la parthénogenèse artificielle. On rétrocroise certains des parthénoclones de P<sub>6</sub> avec CSR<sub>4</sub>. Après la 3<sup>ème</sup> mue, on ne conserve que 250 femelles et on les sépare sur la base des marquages larvaires. On sélectionne cinquante bons cocons, sur la base du poids du cocon (> 1,400 g), du poids de la coque soyeuse (0,250 g) et du % de richesse soyeuse (> 17 %) plus élevés. On recueille les œufs de 30 papillons femelles vierges. On applique la parthénogenèse artificielle pour connaître le niveau de développement parthénogénétique. On retient un lot d'œufs, présentant le développement parthénogénétique et la capacité d'éclosion maximums. On rétrocroise les parthénoclones avec CSR<sub>4</sub> et on applique la parthénogenèse artificielle à chaque génération et on les désigne comme P<sub>7</sub>.

### Evaluation des parthénoclones :

On sélectionne et on évalue quatre hybrides bivoltins, c'est-à-dire P<sub>6</sub> × DNB<sub>1</sub>, P<sub>6</sub> × CSR<sub>2</sub>, P<sub>7</sub> × DNB<sub>1</sub> et P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub>. On compare la performance des hybrides avec le témoin CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub> en laboratoire. On procède à l'évaluation des hybrides par la méthode de l'indice d'évaluation des caractères multiples de Mano et coll., (1993). Pour connaître la variabilité de la taille du cocon, on prend au hasard cent cocons hybrides F<sub>1</sub> et on détermine trois variables pour la taille du cocon, c'est-à-dire la longueur du cocon, la largeur du cocon et le ratio longueur / largeur. Les caractéristiques principales des lignées et des hybrides de vers à soie bivoltins sont présentées dans le Tableau I.

## RESULTATS

La performance de P6 et de P7, en fonction des générations, pour 11 caractères, à savoir le pourcentage de parthénogenèse, le pourcentage d'éclosion, le taux de nymphose, le rendement / 10 000 larves au poids, le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse, le pourcentage de richesse soyeuse y compris les paramètres post cocon, comme la longueur du filament, la capacité de dévidage, le pourcentage de soie grège et la netteté est présentée respectivement dans les Tableaux II et III.

### Performance de P6 :

En F1, on recueille 30 papillons femelles vierges de l'hybride CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub>. On conserve séparément les œufs extraits individuellement de chaque femelle. On induit la parthénogenèse artificielle chez chaque lot d'œufs. On observe une variation distincte entre les différents lots d'œufs. Le développement parthénogénétique varie de 80,78 à 98,40 % avec une moyenne de 88,56 %. La capacité d'éclosion varie entre 61,49 à 86,38 % avec une moyenne de 78,13 %. On retient un lot d'œufs qui présente un taux maximum de développement parthénogénétique (98,40 %) et de capacité d'éclosion (86,38 %) et 425 larves éclosent de ces œufs. Tous les individus parthénogénétiques G1 sont exclusivement des femelles. A partir de G1, on extrait les œufs collectivement de 10 à 15 papillons femelles vierges et on les lève en masse.

### Performance de P7 :

On récroise les parthénoclonés G1 de P6 avec CSR<sub>4</sub>. En G2, on recueille 30 papillons vierges femelles et on extrait les œufs individuellement de chaque femelle. Le développement parthénogénétique varie entre 39,61 et 62,83 % avec une moyenne de 54,93 %. Sur 30, seuls 27 lots d'œufs présentent une capacité d'éclosion, qui varie de 17,46 à 46,55 % avec une moyenne de 23,22 %. On retient le lot d'œufs présentant le taux de développement parthénogénétique (62,83 %) et d'éclosion (46,55 %) maximums et 155 larves éclosent de ces œufs. Tous les individus parthénogénétiques sont exclusivement des femelles.

### Performance des hybrides bivoltins en laboratoire :

On évalue quatre hybrides, c'est à dire P<sub>6</sub> × DNB<sub>1</sub>, P<sub>6</sub> × CSR<sub>2</sub>, P<sub>7</sub> × DNB<sub>1</sub> et P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub> en laboratoire. On compare statistiquement la performance des hybrides avec l'hybride original CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub> pris comme témoin. La performance comparative des hybrides avec CSR<sub>19</sub> × CSR<sub>4</sub> est présentée dans le Tableau IV. Tous les hybrides montrent une supériorité pour au moins 8 caractères sur 11. Deux hybrides à savoir, P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub> et P<sub>7</sub> × DNB<sub>1</sub> présentent les valeurs moyennes les plus élevées pour l'indice d'évaluation de respectivement 57,5 et 54,3. On enregistre une augmentation très significative ( $p < 0,01$ ) pour 9 caractères c'est-à-dire, la fécondité (536), le taux de nymphose (96,4 %), le rendement / 10 000 larves (17,76 kg), le poids du cocon (1,880 g), le poids de la coque soyeuse (0,411 g), le pourcentage de richesse soyeuse (21,85 %), la longueur du filament (1077 m), le pourcentage de soie grège (17,8 %) et la netteté (92) chez P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub>. On a calculé le pourcentage d'amélioration de ces hybrides par comparaison à l'hybride habituel CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub>. On observe un pourcentage d'amélioration plus élevé pour 4 caractères, c'est-à-dire le poids du cocon (6,52 %), le poids de la coque (11,38 %), la longueur du filament (8,68 %) et le pourcentage de soie grège (7,23 %) chez P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub>. On calcule le ratio longueur / largeur du cocon pour connaître la variabilité de la taille du cocon. Bien que le test d'uniformité de la taille du cocon révèle moins de variabilité chez tous les cocons hybrides, qui possèdent un écart type inférieur à 8, on constate que les cocons de deux hybrides à savoir, P<sub>6</sub> × DNB<sub>1</sub> (166,81 ± 6,85) et P<sub>7</sub> × CSR<sub>2</sub> (163,56 ± 6,92), sont comparativement plus uniformes.

## DISCUSSION

La mise au point de lignées de vers à soie par un breeding conventionnel a joué un rôle important pour améliorer à la fois la qualité et la quantité de soie produite (Datta, 1984). Puisque la plupart des caractères quantitatifs chez le ver à soie, sont gouvernés par des polygènes, leur hérédité présente une variation et donc, on accorde plus d'attention à la sélection de lignées de vers à soie en fonction de leur expression phénotypique (Nagaraju, 1998). Parfois, un phénotype convenable peut ne pas présenter un génotype adapté et en raison d'une faible héritabilité, la descendance ultérieure peut perdre son génotype unique. Il est désirable de conserver la copie génotypique exacte du parent chez les descendants (Strunnikov, 1983). De nombreux chercheurs ont passé en revue la parthénogenèse chez le ver à soie du mûrier (Strunnikov, 1975 ; Choudhury, 1989 ; Ravindra Singh et coll., 1997 ; Klimenko, 2001 ; Gangopadhyay et coll., 2005).

Dans cette étude, on a mis au point et évalué deux parthénoclones prometteurs du ver à soie, c'est-à-dire, P6 et P7.

On a adopté les rétrocroisements pour améliorer les caractères commerciaux des parthénoclones. On a utilisé la parthénogenèse artificielle pour obtenir des lignées stabilisées génétiquement et elle s'est avérée très utile pour le breeding de lignées avec une diploïdie restaurée et une dépression consanguine plus faible sans diminution des caractères quantitatifs (Astaurov, 1957 ; Retnakaran et Percy, 1985). On a comparé statistiquement la performance des hybrides, c'est-à-dire  $P_6 \times DNB_1$ ,  $P_6 \times CSR_2$ ,  $P_7 \times DNB_1$  et  $P_7 \times CSR_2$  avec l'hybride original  $CSR_{19} \times CSR_4$ , pris comme témoin. On trouve l'hybride  $P_7 \times CSR_2$  prometteur. On adopte une sélection s'appuyant sur les caractères multiples pour juger de la supériorité du ver à soie de manière impartiale, afin d'évaluer les hybrides du ver à soie désirables (Singh et Subba Rao, 1993 ; Narayanaswamy et coll., 2002 ; Maqbool et coll., 2005). Ravindra Singh et coll., (1998) ont étudié l'uniformité de la taille du cocon chez le ver à soie. On a évalué la convenance de ces hybrides par l'uniformité de la taille de leurs cocons. Tous les hybrides présentent une uniformité de la taille du cocon, avec une forme intermédiaire entre cintrée et ovale, et un écart type inférieur à 8. On a rapporté une observation similaire chez les hybrides mis au point par la parthénogenèse artificielle (Ravindra Singh et coll., 2004).

La performance étudiée en laboratoire montre la supériorité de  $P_7 \times CSR_2$  par rapport au témoin  $CSR_{19} \times CSR_4$ . La parthénogenèse artificielle facilite la transformation d'un génotype unique très hétérotique en des variants génotypiques différents avec un degré variable d'hétérozygotie entre les gènes utiles et nuisibles (Strunnikov, 1986). Strunnikov (1995) a observé 30 % de soie en plus chez un hybride comprenant le parthénoclone -43 comme composant, qui présente une viabilité des œufs de 80 à 90 %, une viabilité larvaire de 90 à 95 %, un poids du cocon de 2 à 2,4 g, une longueur de filament de 1 300 m et une productivité de la soie de 23 à 24,5 %. On a utilisé les parthénoclones améiotiques, pour la création de nouveaux hybrides  $F_1$ , pour la production industrielle de cocons (Petkov et coll., 2005). On pourrait utiliser les lignées mises au point en appliquant la parthénogenèse artificielle comme matériaux ressources pour la mise au point de lignées de vers à soie supérieures afin d'obtenir des copies identiques sur le plan génétique. Dans cette étude, les cocons des hybrides  $F_1$  entre  $P_6 / P_7$  et les lignées bivoltines présentent moins de variabilité phénotypique. Il faudrait entreprendre des études supplémentaires pour connaître le niveau d'homozygotie des parthénoclones par les empreintes ADN.



## STUDIES ON REELING - EFFECT OF COCOON COOKING CONDITION AND REELING SPEED ON REELING PERFORMANCE AND QUALITY OF RAW SILK OF INDIAN MULTIBIVOLTINE COCOONS

SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR

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

*The influence of cocoon cooking condition and reeling speed on reeling performance and quality characteristics of raw silk of Multi-bivoltine cocoons has been studied. Two cooking methods i. e. single pan and pressurized, and nine levels of reeling speeds on CSTRI multiend reeling machine i.e. 50mtrs/min, 70mtrs/min, 90mtrs/min, 110mtrs/min, 130mtrs/min, 150mtrs/min, 170mtrs/min, 190mtrs/min and 210mtrs/min have been considered for the study. It is observed that as the reeling speed increases reelability, non-broken filament length and raw silk % are found to decrease, where as thread troubles are found to increase significantly. Elongation, neatness and cleanness of raw silk were found to decrease and tenacity and cohesion of raw silk were found to increase as the reeling speed increases. Slow speed reeling and pressurized cooking method give better reelability, raw silk recovery and quality of raw silk, whereas high speed reeling particularly with open pan cooking affect both reeling characteristics and quality of raw silk significantly. Results indicate that cooking of the cocoons to the required level and maintaining the reeling speed in the range of 90~110m/min are essential for achieving better reeling performance and quality raw silk with optimum production from CSTRI multiend reeling machine.*

**Keywords:** Cooking method, reeling speed, reelability, raw silk %, cleanness, Tenacity, elongation and cohesion.

### INTRODUCTION

Cocoon cooking conditions and reeling speed are the important parameters of reeling process which have direct relationship with raw silk recovery, productivity and quality of raw silk. Silk fibre being proteinous in nature is rendered weak under wet condition and structural changes could be expected to occur during reeling because of reeling tension and hence influence mechanical properties of the filaments.

Extensive studies have been conducted to study the influence of reeling speed on reeling performance and quality of raw silk (Sato *et al.*, 1966, Yoshiro Masago 1968, Hagiwara 1968, Subhas *et al.*, 2005) using bivoltine hybrid cocoons. Further, much of these studies have been conducted using conveyor cocoon cooking machine and automatic reeling. Information on the influence of variation in cocoon cooking conditions and reeling speed on reelability raw silk recovery, reeling tension, and quality of silk in the case of multiend reeling particularly with multibivoltine cocoons is scanty. Therefore, studies have been undertaken on CSTRI multiend reeling machine to investigate the influence of cocoon cooking condition and reeling speed and in combination on reeling characteristics and quality of raw silk.

## MATERIALS AND METHODS

### Raw Material:

Multibivoltine cocoons (PM × NB<sub>4</sub>D<sub>2</sub>) procured from the Government Cocoon markets were used for the study.

### Experimental design:

The study has been carried out varying two factors i. e. the Cocoon cooking methods (factor A, 2 levels) and Reeling speed ( factor B, 9 levels), keeping the other parameters constant.).

### Cocoon drying:

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

### Cocoon cooking:

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

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

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

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

### Brushing:

Cooked cocoons were brushed in water at 80°C.

### Reeling:

The cocoons were reeled on CSTRI Multiend reeling machine by maintaining nine levels of reeling speeds i. e. 50mtrs/min, 70mtrs/min, 90mtrs/min, 110mtrs/min, 130mtrs/min 150mtrs/min, 170mtrs/min, 190mtrs/min and 210mtrs/min with the following constant parameters:

- Basin water temperature: 40°C  
Croissure length : 8 cms  
CSTRI reeling buttons with 250 microns hole diameter.

### Small reel permeation:

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

### Re-reeling:

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

### Water quality:

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

### **Reeling data:**

Reeling characteristics i. e., reelability, raw silk % and waste% on silk weight and raw silk% were calculated from the reeling results obtained during reeling of different combinations as per the design of experiment.

### **Raw silk testing:**

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

### **Statistical analysis:**

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

## **RESULTS AND DISCUSSIONS**

### **Reeling characteristics:**

Average results of influence of cocoon cooking conditions and reeling speed on reeling characteristics are at Table I and Figures 1 to 4. Analysis of variance of reeling characteristics is in Table II.

### **Reelability and non-broken filament length:**

It is observed (Figures 1 and 2 and Table II) that cocoon cooking method and reeling speed have significant influence on reelability and non broken filament length of the cocoons. Influence of both cocoon cooking condition and reeling speed on reelability and non broken filament length of cocoon is significant at 1% level.

Reelability and non broken filament length of the cocoons are found to be significantly better in the case of pressurized cooking method as compared to those of open pan cooking method with all the reeling speeds maintained. This can be attributed to better swelling and softening of sericin of all the cocoon filament layers and filament crossover points in the cocoon shell in the case of pressurized cocoon cooking method.

It is to be noted that reelability and non-broken filament length have a direct bearing on cocoon droppings during reeling and hence influence the maintenance of cocoons by the reeler as per the required denier. Therefore, achieving good reelability and non broken filament length from a given lot of cocoons by adopting good cocoon cooking technology and optimum reeling speed is essential for achieving better results in the reeling filatures. It is observed (Figures 1 and 2 ) that as the reeling speed increases reelability and non broken filament length are found to decrease significantly with both open pan cooking method and pressurized cooking method. Reelability and non broken filament length of cocoons were found to be affected severely due to higher reeling speed associated with open pan cooking method.

The decrease in the reelability and non broken filament length as the reeling speed increases can be attributed to the fact that as the reeling speed increases, unwinding tension of cocoon filament and rate of oscillating movement of the cocoon during reeling increases, the cocoons are drawn closer in the reeling basin increasing the friction between the cocoons surfaces. Due to the combined effect of these, breakage of the cocoon filament increases depending on cooking conditions, weak points in the filament and cocoon characteristics and this results in reduction of reelability of cocoons. Decrease in reelability with the increase in reeling speed has resulted in the decrease of non-broken filament length of cocoons (at higher reeling speed).



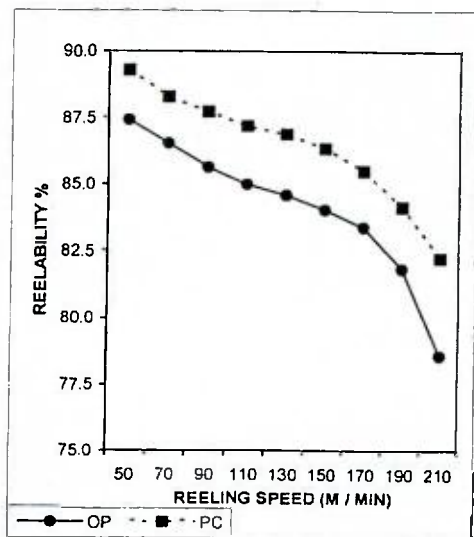


Figure 1. Influence of cocoon cooking condition and reeling speed on reelability.

OP - Open pan cooking. PC - Pressurized cooking.

Figure 1. Influence de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la dévidabilité.

OP - Cuisson ouverte à la bassine. PC - Cuisson pressurisée.

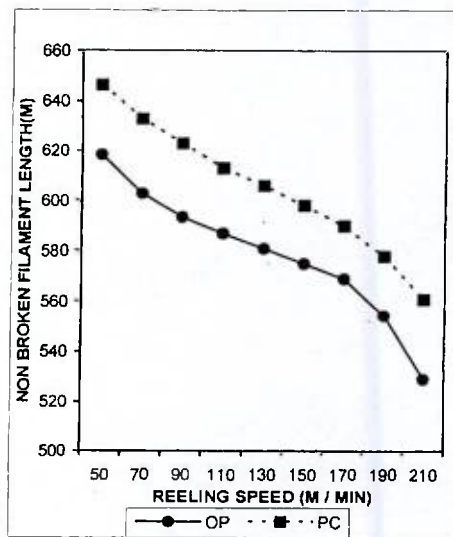


Figure 2. Influence of cocoon cooking condition and reeling speed on non-broken filament length.

OP - Open pan cooking. PC - Pressurized cooking.

Figure 2. Influence de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la longueur du filament sans rupture.

OP - Cuisson ouverte à la bassine. PC - Cuisson pressurisée.

### Raw silk percentage, waste % and pelade waste:

Results given in the Tables I & II indicate that influence of cocoon cooking method and reeling speed on raw silk percentage, waste%, pelade waste is statistically significant at 1% level.

It is observed (Table I) that as the reeling speed increases from 50 m / min to 210mtrs/min, raw silk% are found to decrease significantly. This is due to the significant reduction in the reelability of cocoons as the reeling speed increases leading to more number of droppings during reeling. More number of cocoon droppings has resulted in increased waste % (Figure 3) and hence reduced the raw silk recovery and raw silk %.

Further, from the Table I it is observed that pelade waste is at higher side in the case of higher reeling speeds as compared to slow reeling speeds. This is due to increase in reeling tension at a higher reeling speed and while during reeling of inner layers of cocoons, the chances of breakage of filament before reeling of inner cocoon shell layers to the required level is more leading to increased pelade waste. Reduction in raw silk percentage at high reeling speed is also due to increased pelade waste.

Single (open) pan cooking method particularly at higher reeling speed range has affected the raw silk recovery severely. Whereas, pressurized cooking method has resulted in significantly better raw silk recovery and hence better raw silk%. This can be attributed to better swelling and softening of sericin of all the cocoon filament layers uniformly in the case of pressurized cooking method.

**Table I. Effect of cocoon cooking condition and reeling speed on reeling characteristics.****Tableau I. Effets de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur les caractéristiques de dévidage.**

Reeling speed (m / min)	Raw silk %		20 Pelade weight (g)		Thread troubles per 10,000 m silk reeled	
	Open pan Cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking
<i>Vitesse de dévidage (m / min)</i>	<i>% de soie grège</i>		<i>Poids de la pélette 20 (g)</i>		<i>Problèmes de fil pour 10 000 m de soie dévidée</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>
50	12.21	13.13	0.378	0.360	1.14	1.13
70	11.99	12.84	0.391	0.367	1.80	1.15
90	11.91	12.78	0.406	0.372	2.37	1.17
110	11.86	12.72	0.409	0.361	2.39	1.93
130	11.70	12.58	0.416	0.390	2.42	2.33
150	11.67	12.44	0.459	0.409	3.34	2.38
170	11.62	12.31	0.494	0.430	4.07	2.98
190	11.56	12.21	0.508	0.437	4.15	3.69
210	11.46	11.94	0.589	0.452	6.20	4.05
CD ( $P \leq 0.05$ ) for cooking method (A)	0.04		0.006		0.07	
CD ( $P \leq 0.05$ ) pour la méthode de cuisson (A)						
Reeling speed (B)	0.08		0.014		0.16	
Vitesse de dévidage (B)						
A × B	0.11		0.019		0.22	

**Thread troubles during reeling:**

The thread troubles have been found to be significantly influenced by both the cocoon cooking method and reeling speed (Tables I and II). It is observed that occurrence of thread troubles in the case of pressurized cooking method is significantly less than that of open pan cooking method. This is attributed to better and uniform softening of sericin of cocoon filament crossover points in the cocoon shell. More occurrence of thread troubles in the case of open pan cooking method is attributed to under/uneven cooking of cocoons. Further, because of under cooking, inner layers of cocoons will not be softened to the required level and the cocoons (because of light weight) jump along with the thread and get arrested at the button activating the individual reel stop motion. Under cooking also leads to frequent droppings followed by repeated brushings. Frequent droppings and repeated brushings over soften the inner layers. This over softening disintegrates the thin inner layers of the shell and these broken shell layers are drawn along with raw silk and are arrested at the buttons

resulting in thread troubles. The nature of thread troubles due to pelade in case of under cooking depends on cocoon characteristics (particularly reelability) and degree of under cooking.

It is observed (Table I & II) that occurrence of thread troubles per unit time increases as the reeling speed increases. It is to be noted that at higher reeling speeds, the chances of occurrence of slugs and rupture of pelade is high due to the higher rate at which cocoon filaments are unwound from the cocoons as compared to slow reeling speed and hence resulting in thread troubles. Further as the reeling speed increases length of raw silk reeled per unit time increases and hence number of thread troubles per unit time increases. The rate of occurrence of thread troubles during reeling is one of the important parameters which have to be taken in to consideration in fixing the reeling speed.

#### Quality characteristics of raw silk:

Average results of influence of cocoon cooking conditions and reeling speed on quality characteristics of raw silk are at Table III and Table IV. Analysis of variance of quality characteristics are at Table V.

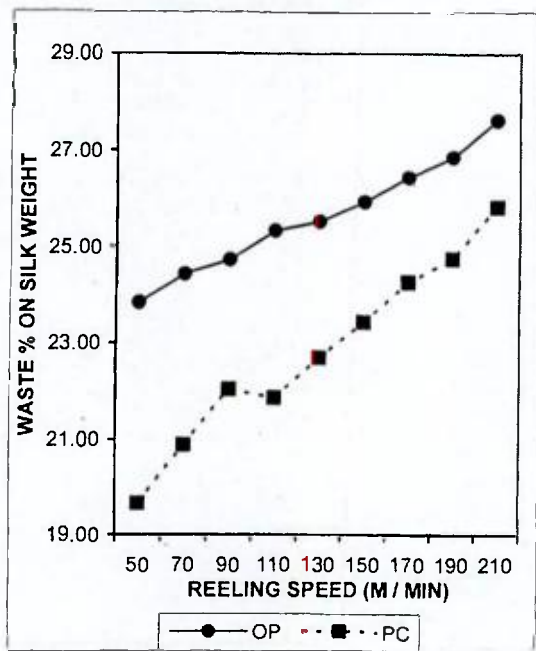
**Table II. Analysis of variance of reeling performance results.**

*Tableau II. Analyse de variance pour les résultats de la performance de dévidage.*

Factors	Mean sum of squares						
	Degree of freedom	Reelability	Non broken filament length	Raw silk %	Silk Waste	Pelade weight	Thread troubles
Facteurs	Somme moyenne des carrés						
	Degrés de liberté	Dévidabilité	Longueur du filament sans rupture	% de soie grège	Déchets de soie	Poids de la pélette	Problèmes de fil
Cooking method (A) 1 <i>Méthode de cuisson (A)</i>		46.923**	6293.776**	5.398**	70.953**	0.025**	5.562**
Reeling speed (B) 8 <i>Vitesse de dévidage (B)</i>	8	23.277**	2852.438**	0.355**	9.892**	0.011**	6.645**
A × B	8	0.302 <sup>NS</sup>	13.465 <sup>NS</sup>	0.020**	0.6212**	0.001**	0.432**
Error / <i>Ecart</i>	18	0.153	11.944	0.003	0.079	0.000	0.011

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





**Figure 3. Influence of cocoon cooking condition and reeling speed on waste % on silk weight.**

OP - Open pan cooking. PC - Pressurized cooking.

*Figure 3. Influence de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur le % de déchets par rapport au poids de la soie.*

*OP - Cuisson ouverte à la bassine. PC - Cuisson pressurisée.*

#### Neatness and low neatness of raw silk:

Results indicate (Table III) that as the reeling speed increases, neatness and low neatness of raw silk are found to decrease. Slow speed reeling in association with pressurized cooking method has resulted in significantly better neatness and low neatness of raw silk as compared to open pan cooking. This is due to better swelling and softening of sericin of filament cross over points in the cocoon shell in the case of pressurized cooking method.

It is observed from the analysis of variance results (Table V) that influence of cocoon cooking method on neatness and low neatness of raw silk is significant at 1% level. However, the influence of reeling speed on neatness and low neatness of raw silk is insignificant.

#### Cleanness of raw silk:

It is observed (Table III) that cocoon cooking method and reeling speed have significant influence on cleanness of raw silk. Influence of cocoon cooking method and reeling speed on cleanness of raw silk is significant at 1% level (Table V).

Results indicate that as the reeling speed increases, cleanness of the raw silk is found to decrease significantly. This is due to the fact that as the reeling speed increases rate of filament unwinding and reeling tension increases. High reeling speeds increases the chances of occurrence of loops in raw silk and more number of crossover points getting unwound without straightening during reeling leading to the formation of cleanness (loops/nibs/slugs) defects in the reeled thread. Slow reeling speed associated with pressurized cooking method has given significantly better cleanness of raw silk as compared to the other conditions.

**Table III. Influence of cocoon cooking condition and reeling speed on quality characteristics of raw silk.**

*Tableau III. Influence de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur les caractéristiques de qualité de la soie grège.*

Reeling Speed (m / min.)	Neatness (%)		Low neatness (%)		Cleanness (%)	
	Open pan Cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking
Vitesse de dévidage (m / min.)	Netteté (%)		Netteté minimum (%)		Propreté (%)	
	Cuisson ouverte à la bassine	Cuisson pressurisée	Cuisson ouverte à la bassine	Cuisson pressurisée	Cuisson ouverte à la bassine	Cuisson pressurisée
50	89.0	90.0	85.0	87.5	95.0	97.0
70	89.0	90.0	85.0	86.5	94.5	96.5
90	88.5	90.0	85.0	85.0	94.0	95.5
110	88.0	89.5	84.0	85.0	93.3	95.0
130	88.0	89.0	82.5	85.0	92.5	94.5
150	87.5	89.0	82.5	84.0	92.0	93.5
170	87.0	88.0	80.0	84.0	90.5	93.3
190	85.5	87.5	79.0	92.5	88.0	91.5
210	84.0	87.0	77.5	80.0	84.5	88.5
CD ( $P \leq 0.05$ ) for cooking method (A)	0.261		1.43		0.378	
CD ( $P \leq 0.05$ ) pour la méthode de cuisson (A)	0.261		1.43		0.378	
Reeling speed (B)	0.553		3.03		0.802	
Vitesse de dévidage (B)	0.553		3.03		0.802	
A × B	0.783		4.23		1.13	

Pressurized cooking method has given significantly better cleanness of raw silk as compared to open pan cooking method with all the reeling speeds maintained. This is attributed to better and uniform swelling and softening of sericin of cocoon filament crossover points in the cocoon shell in the case of pressurized cooking of cocoons.

**Table IV. Influence of cocoon cooking condition and reeling speed on quality characteristics of raw silk.**

**Tableau IV. Influence de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur les caractéristiques de qualité de la soie grège.**

	Tenacity (g/d)		Elongation (%)		Cohesion (no. of strokes)	
	Open pan Cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking	Open pan cooking	Pressurised cooking
	<i>Résistance (g/d)</i>		<i>Allongement (%)</i>		<i>Cohésion (nbre de coups)</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>
Reeling speed <i>Vitesse de dévidage</i> (m / min.)						
50	3.67	3.71	21.00	24.72	376	61
70	3.70	3.73	20.19	24.19	42	63
90	3.72	3.75	19.42	23.65	46	69
110	3.73	3.78	19.34	23.11	49	72
130	3.76	3.79	18.69	22.50	52	76
150	3.77	3.83	18.50	22.05	57	78
170	3.81	3.86	17.90	21.15	62	80
190	3.88	3.90	17.45	20.37	65	83
210	3.92	3.94	17.10	18.71	72	87
CD ( $P \leq 0.05$ ) for Cooking method (A) <i>CD (<math>P \leq 0.05</math>) pour la méthode de cuisson (A)</i>	0.01		0.108		1.0697	
Reeling speed (B) <i>Vitesse de dévidage (B)</i>	0.022		0.229		2.269	
A × B	0.031		0.325		3.209	



**Reeling tension:**

Figure 4 indicate that as the reeling speed increases reeling tension increases significantly. It is also observed that, Pressurized cooking method has resulted in significantly lower reeling tension as compared to open pan cooking method in all the speed range. Results indicate that the influence of both cocoon cooking method and reeling speed on reeling tension is significant at 1% level (Table V).

Significantly lower reeling tension in the case of pressurized cooking method is attributed to better and uniform softening of the sericin of cocoon filament crossover points. Higher reeling tension in the case of open pan cooking method as compared to pressurized cooking method can be attributed to under softening of the sericin of the cocoon filament layers.

Increase in reeling tension as the reeling speed increases is due to increase in the oscillating movement of the cocoons during reeling, which leads to variation in the cocoon filament exfoliation angle and hence exfoliation tension leading to varying/increasing total reeling tension (Takabayashi 1993). Further, as stated earlier cocoons are drawn close to each other in the reeling basin with the increase in reeling speed increasing the friction between the cocoons surfaces leading to increase in reeling tension. Nakagawa has developed an equation relating to reeling speed and reeling tension which is as follows (Takashi Omura 1981)

$$T = A + d V^n$$

Where,

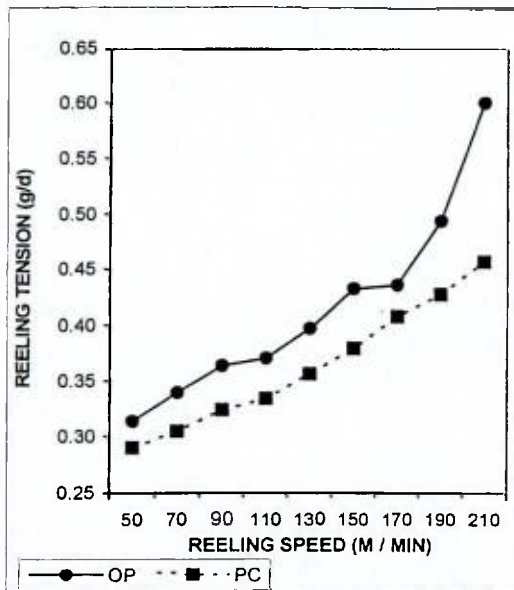
T = Raw silk reeling tension (g/10 denier)

A = Tension regardless of silk reeling speed (g/10 denier)

d = Speed coefficient (g/10 denier)

V = Silk reeling speed (m/min)

n = Speed exponent



**Figure 4. Influence of cocoon cooking condition and reeling speed on reeling tension.**

OP - Open pan cooking. PC - Pressurized cooking.

**Figure 4. Influence de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la tension de dévidage.**

OP - Cuisson ouverte à la bassin. PC - Cuisson pressurisée.

**Tenacity of raw silk:**

It is observed (Tables IV and V) that both cocoon cooking condition and reeling speed have significant influence (at 1% level) on tenacity of raw silk. Pressurized cooking method has resulted

in better tenacity of raw silk as compared to open pan cooking method. This may be attributed to better swelling and softening of sericin of filament crossover points in the cocoons in case of pressurized cooking method as compared to under/uneven cooking of cocoons in case of open pan method. This is also due to more sericin dissolution during cooking in the case of pressurized cooking method as compared to open pan cooking method leading to decrease in denier and hence increase in tenacity of raw silk.

Results indicate that as the reeling speed increases, the tenacity of the raw silk increases. This is due to the fact that as the reeling speed increases, the reeling tension increases (Figure 4) leading to orientation of fibrils in the fibroin of the cocoon filament. Better orientation of fibrils in the fibroin can be expected to increase the tenacity 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.*

Factors	Mean sum of squares							
	Degree of freedom	Neatness	Low Neatness	Cleanness	Reeling tension	Tenacity	Elongation	Cohesion
	<i>Somme moyenne des carrés</i>							
Facteurs	Degré de liberté	Netteté	Netteté minimum	Propreté	Tension de dévidage	Résistance	Allongement	Cohésion
Cooking methods (A) <i>Méthodes de cuisson (A)</i>	1	20.250**	40.111**	49.000**	0.024**	0.011**	105.816**	3885.444**
Croissure length (B) <i>Longueur de croissure (B)</i>	8	7.757**	24.063**	36.703**	0.021**	0.025**	10.136**	406.403**
A × B	8	0.438*	1.549 <sup>NS</sup>	0.797*	0.001**	0.000 <sup>NS</sup>	0.618**	8.569*
Error / <i>Ecart</i>	18	0.139	4.167	0.292	0.000	0.000	0.024	2.333

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

#### **Elongation of raw silk:**

The analysis of variance results (Table V) indicate that the influence of cocoon cooking method and reeling speed on elongation of raw silk is significant at 1% level. It is observed that pressurized

cooking method has given significantly better elongation of raw silk as compared to that of open pan cooking method (Table IV). This can be attributed to better swelling and softening of sericin of cocoon filament cross over points and all the filament layers of cocoon shell uniformly. Significant reduction in elongation of raw silk in the case of single pan cooking method is attributed to under cooking of cocoons. It is to be noted that under cooking of cocoons increases the cocoon filament exfoliation tension, which in turn increases the total reeling tension (Subhas 1996). Higher reeling tension seems to have affected the elongation of raw silk.

From the Table IV it is observed that as the reeling speed increases elongation of raw silk decreases significantly. This can be attributed to the fact that as the reeling speed increases, the reeling tension increases leading to orientation of fibrils in the fibroin of the cocoon filament thereby decreasing the elongation of raw silk.

#### **Cohesion of raw silk:**

It is observed (Table IV) that both cocoon cooking condition and reeling speed have significant influence on cohesion of raw silk. Influence of cocoon cooking method and reeling speed on cohesion of raw silk is significant at 1% level (Table V).

The pressurized cooking method has given significantly better cohesion of raw silk as compared to open pan method. This is due to better and uniform swelling and softening of sericin of cocoon filament layers in the case of pressurized cooking method. It is to be noted that proper agglutination of filaments in the raw silk thread will take place only when the sericin of cocoon filament layers is properly softened. Reduction in cohesion of raw silk in the case of open pan cooking method is attributed to under/uneven softening of sericin. Results indicate that in order to achieve good cohesion of raw silk, swelling and softening of sericin of the cocoon filament layers to the required level by cooking the cocoons effectively is essential.

Results indicate that as the reeling speed increases cohesion of raw silk increases. This can be attributed to the fact that as the reeling speed increases, reeling tension increases significantly (Figure 4). This will contribute for increasing of the agglutination between cocoon filaments during reeling and hence increase in the cohesion of raw silk. It is to be noted that as the reeling tension increases, friction between the two threads in the croissure part increases leading to increased agglutination between cocoon filaments.

## **CONCLUSION**

Cocoon cooking condition and reeling speed have significant influence on reeling performance and quality of raw silk. Results indicate that very slow reeling speeds (50 ~ 70 m /min) give better reelability, raw silk recovery and quality of silk. It is to be noted that slow speed reeling reduces the productivity per unit duration significantly. Whereas high reeling speeds (above 130 m / min) may increase the productivity per unit duration up to certain range, but reduce the reelability and raw silk recovery and affect the quality of raw silk significantly. Therefore cooking of the cocoons to the optimum level and selection of optimum reeling speed depending upon the target productivity and raw silk grade are the essential requirements for achieving better techno-economic advantages.

In order to achieve better techno-economic advantage under Indian conditions it is essential to produce 1 Kg of raw silk per basin (10 ends) per person per shift of 8 hours. Therefore, from the results, 90mtrs/min ~ 110 m/min reeling speed is recommended in the case of CSTRI multiend reeling machine for the production of quality silk with optimum yield and production from Multibivoltine cocoons.



## REFERENCES

- YOSHIRO MASAGO, SHIRO ONA, FUSAKICHI NAHAGAU (1968). On the theological properties of raw silk in various condition for silk reeling, Report of silk science research institute, Japan, No.16, 47-62.
- HAGIWARA AND SHIMADA (1968) "Relation between the reeling tension and raw silk property, Magazine of silk research", Japan Silk Association, Japan, No.18, 60-63.
- SUBHAS, V. NAIK AND SOMASHEKAR.T.H. (2005) "Studies on bivoltine cocoon reeling Part I: Effect of cocoon cooking condition and reeling speed on the reeling performance of Indian bivoltine hybrid cocoons" Japanese Society of Silk Science and Technology, 14, 61-65.
- SUBHAS, V. NAIK AND SOMASHEKAR.T.H. (2005) "Studies on bivoltine cocoon reeling Part II: Influence of cocoon cooking condition and reeling speed on quality characteristics of raw silk of Indian bivoltine hybrid cocoons" Japanese Society of Silk Science and Technology, 14, 67-72.
- TAKABAYASHI.C (1993): Dynamic analysis of the exfoliation tension of a cocoon filament and verification by simulation experiments, J. Seric. Sci., JPN, 62, 20.29
- TAKASHI OMURA(1981) "Silk reeling techniques in tropics" Japan International Co-operation Agency, Tokyo, Japan, 1981.
- SUBHAS, V. NAIK, TAKABAYASHI, C. AND 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.

# ETUDES SUR LE DEVIDAGE - EFFET DE LA CONDITION DE CUISSON DES COCONS ET DE LA VITESSE DE DEVIDAGE SUR LA PERFORMANCE DE DEVIDAGE ET LA QUALITE DE LA SOIE GREGE DES COCONS POLYBIVOLTINS INDIENS

SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR

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

*On a étudié l'influence de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la performance de dévidage et les caractéristiques de qualité de la soie grège de cocons poly-bivoltins. Pour l'étude, on a pris en considération deux méthodes de cuisson, c'est-à-dire à la bassine unique et pressurisée et neuf niveaux de vitesse de dévidage sur une bassine de dévidage multibouts, c'est-à-dire 50 m / min., 70 m / min., 90 m / min., 110 m / min., 130 m / min., 150 m / min., 170 m / min., 190 m / min. et 210 m / min. On observe que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la capacité de dévidage, la longueur du filament sans rupture et le % de soie grège baissent, tandis que les problèmes de fil augmentent de manière significative. On constate que l'allongement, la netteté et la propreté de la soie grège baissent et que la résistance et la cohésion de la soie grège augmentent lorsque la vitesse de dévidage augmente. Une vitesse de dévidage lente et la méthode de cuisson pressurisée donnent de meilleures dévidabilité, rentrée de soie grège, et qualité de soie grège, tandis que la vitesse de dévidage élevée, particulièrement avec la cuisson ouverte à la bassine, atteint significativement à la fois les caractéristiques de dévidage et la qualité de la soie grège. Les résultats indiquent que la cuisson des cocons au niveau requis et le maintien de la vitesse de dévidage dans la fourchette de 90-110 m / min sont essentiels pour obtenir une meilleure performance de dévidage et une meilleure qualité de soie grège, avec une production optimale de soie, à partir d'une bassine de dévidage multibouts du CSRTI.*

## INTRODUCTION

Les conditions de cuisson des cocons et la vitesse de dévidage sont des paramètres importants du processus de dévidage, en relation directe avec la rentrée de soie grège, la productivité et la qualité de la soie grège. La fibre de soie étant de nature protéique, elle s'affaiblit dans des conditions d'humidité et on peut s'attendre à ce qu'il se produise des changements structuraux pendant le dévidage à cause de la tension de dévidage, ce qui a donc une influence sur les propriétés mécaniques des filaments.

On a réalisé des études approfondies pour étudier l'influence de la vitesse de dévidage sur la performance de dévidage et sur la qualité de la soie grège (Sato et coll., 1966, Yoshiro Masago, 1968 ; Subhas et coll., 2005) en utilisant des cocons bivoltins hybrides. De plus, on a réalisé la plupart de ces études en utilisant une machine de cuisson des cocons à convoyeur et un dévidage automatique. L'information sur l'influence de la variation des conditions de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la dévidabilité, sur la rentrée de soie grège, sur la tension de dévidage et sur la qualité de la soie dans le cas du dévidage multibouts particulièrement avec des cocons polybivoltins est rare. On a donc réalisé ces études sur une bassine de dévidage du CSRTI multibouts pour étudier l'influence

de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage et de leur association sur les caractéristiques de dévidage et sur la qualité de la soie grège.

## MATERIELS ET METHODES

### Matière première :

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

### Conception expérimentale :

On a réalisé l'étude en faisant varier deux facteurs, c'est-à-dire les méthodes de cuisson des cocons (facteur A, 2 niveaux) et la vitesse de dévidage (facteur B, 9 niveaux) en conservant les autres paramètres constants.

### Séchage des cocons :

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

### Cuisson des cocons :

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

Dans le cas de la méthode à la bassine ouverte, en utilisant une casserole unique, on cuit les cocons à 95° C pendant 2 minutes. On procède à la cuisson pressurisée des cocons en utilisant une machine circulaire de cuisson pressurisée du CSRTI en employant les paramètres suivants de cuisson .

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

### Purgeage :

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

### Dévidage :

On dévide les cocons sur une bassine de dévidage multibouts du CSRTI en maintenant neuf niveaux de vitesses de dévidage, c'est-à-dire 50 m / min., 70 m / min, 90 m / min, 110 m / min, 130 m / min., 150 m / min, 170 m / min, 190 m / min et 210 m / min avec les paramètres constants suivants :

Température de l'eau à la bassine	40° C
Longueur de croisure :	8 cm
Passes-fils du CSRTI au trou d'un diamètre de 250 microns.	

### Imprégnation sur petit dévidoir :

On trempe les petits dévidoirs dans l'eau en utilisant une chambre d'imprégnation à vide à petit dévidoir du CSRTI en ayant recours à un vide de 300 mm d'Hg. On répète le cycle trois fois.



**Reflottage :**

On reflotte la soie grège en utilisant une bassine de reflottage de type étroit avec une vitesse de reflottage de 225 m / min, une température de 40° C et une HR de 45 % dans la bassine de reflottage.

**Qualité de l'eau :**

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

**Données de dévidage :**

On calcule les caractéristiques de dévidage, c'est-à-dire la dévidabilité, le % de soie grège, le % de déchets par rapport au poids de la soie et par rapport au % de soie grège, en fonction des résultats de dévidage obtenus avec les différentes combinaisons, d'après la conception de l'expérience.

**Test de soie grège :**

On teste les caractéristiques de propreté, de netteté et de netteté minimum des échantillons de soie grège en utilisant un testeur Scriplane et le caractère de cohésion en utilisant un testeur de cohésion Duplan, en adoptant une procédure ISA. De plus, on teste la résistance et l'allongement de la soie grège en utilisant un testeur de rupture Instron, en suivant une procédure standard.

**Analyse statistique :**

On analyse les données recueillies de manière statistique en utilisant une analyse de variance à deux facteurs.

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Caractéristiques de dévidage :**

Les résultats moyens concernant l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur les caractéristiques de dévidage sont présentés dans le Tableau I et les figures 1 à 4. L'analyse de variance pour les caractéristiques de dévidage est présentée dans le Tableau II.

**Dévidabilité et longueur du filament sans rupture :**

On observe (Figures 1 et 2 et Tableau II) que la méthode de cuisson des cocons et la vitesse de dévidage ont une influence significative sur la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture des cocons. L'influence à la fois de la condition de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la capacité de dévidage et sur la longueur du filament sans rupture du cocon est significative au seuil de 1 %.

On constate que la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture des cocons s'avèrent significativement meilleures dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée, par comparaison à la méthode de cuisson ouverte à la bassine, avec toutes les vitesses de dévidage. On peut attribuer cela à un meilleur gonflement et ramollissement de la séricine dans toutes les couches du cocon et dans les points de croisement du filament de la coque soyeuse.

On doit noter que la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture ont un effet direct sur les cassures pendant le dévidage et elles influencent donc le maintien des cocons par le filateur en fonction du denier nécessaire. Pour obtenir de bonnes dévidabilité et longueur de filament sans rupture, à partir d'un lot de cocons donné, il est essentiel d'adopter une bonne technologie de cuisson des cocons et une vitesse de dévidage optimale. On observe (Figures 1 et 2) que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture baissent significativement à la fois avec la méthode de cuisson ouverte à la bassine et avec la méthode de cuisson pressurisée. La dévidabilité et la longueur du filament sans rupture des cocons sont très sérieusement affectées par une vitesse de dévidage élevée, associée à une méthode de cuisson à la bassine ouverte.

On peut attribuer la baisse de la capacité de dévidage et de la longueur du filament sans rupture, lorsque la vitesse de dévidage augmente, au fait que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la tension de déroulement du filament du cocon et le taux du mouvement d'oscillation du cocon pendant le dévidage augmentent, les cocons se rapprochent dans la bassine de dévidage, ce qui augmente la friction entre les surfaces des cocons. En raison de l'effet combiné de tout cela, il se produit une augmentation des ruptures du filament du cocon en fonction des conditions de cuisson, des points faibles du filament et des caractéristiques du cocon et cela entraîne la diminution de la dévidabilité des cocons. La baisse de la dévidabilité, avec l'augmentation de la vitesse de dévidage, entraîne la diminution de la longueur du filament sans rupture (à une vitesse de dévidage plus élevée).

#### **Pourcentage de soie grège, % de déchets et déchets de pélette :**

Les résultats présentés dans les Tableaux I et II indiquent que l'influence de la méthode de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur le pourcentage de soie grège, sur le % de déchets, sur les déchets de pélette est significative au seuil de 1 %.

On observe (Tableau I) que lorsque la vitesse de dévidage augmente de 50 m / min à 210 m / min., le % de soie grège baisse de manière significative. Cela est dû à la baisse significative de la dévidabilité des cocons lorsque la vitesse de dévidage augmente, ce qui entraîne plus de cassures pendant le dévidage. Le nombre plus important de cassures entraîne l'augmentation du % de déchets (Figure 3) et cela diminue donc le % de rentrée de soie grège et le % de soie grège.

De plus, d'après le Tableau I, on observe que les déchets de pélette sont à la hausse dans le cas de vitesses de dévidage plus importantes par comparaison à des vitesses de dévidage lentes. Cela est dû à l'augmentation de la tension de dévidage et pendant le dévidage des couches internes des cocons, les chances de rupture du filament avant le dévidage au niveau requis sont plus propices à l'augmentation des déchets de pélette. La diminution du pourcentage de soie grège à une vitesse de dévidage plus élevée est aussi due à l'augmentation des déchets de pélette.

La méthode de cuisson à la bassine unique (ouverte), particulièrement avec une fourchette de vitesses de dévidage plus élevée, atteint sévèrement le % de soie grège, tandis que la méthode de cuisson pressurisée entraîne significativement une meilleure rentrée de soie grège et donc un meilleur % de soie grège. On peut attribuer cela au gonflement et au rammollissement meilleurs et uniformes de la séricine dans toutes les couches du filament de cocon dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée.

#### **Problèmes de fil pendant le dévidage :**

On a constaté que les problèmes de fil sont significativement influencés à la fois par la méthode de cuisson du cocon et par la vitesse de dévidage (Tableaux I et II). On observe que la présence de problèmes de fil, dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée, est significativement moins importante que dans le cas de la méthode de cuisson ouverte à la bassine. On attribue cela à l'amollissement meilleur et uniforme de la séricine aux points de croisement du filament de cocon dans la coque soyeuse. On attribue la fréquence plus importante des problèmes de fil, dans le cas de la méthode de la cuisson ouverte à la bassine, à la sous-cuisson ou à la cuisson inégale des cocons. De plus, en raison de la sous-cuisson, les couches internes des cocons ne seront pas ramollies au niveau désiré et les cocons (en raison de leur poids léger) sautent avec le fil et sont arrêtés au bouton qui active le mouvement individuel d'arrêt du dévidoir. La sous-cuisson entraîne aussi des cassures fréquentes suivies par des purgeages répétés. Ce sur-amollissement désintègre les couches internes fines de la coque et ces couches de coque cassées sont tirées avec la soie grège et sont arrêtées dans les passes-fils, ce qui entraîne des problèmes de fil. La nature des problèmes de fil dus à la pélette, dans le cas de la sous-cuisson, dépend des caractéristiques du cocon (particulièrement de la dévidabilité) et du degré de sous-cuisson.

On observe (Tableaux I & II) que la présence de problèmes de fil par unité de temps augmente lorsque la vitesse de dévidage augmente. On doit noter qu'avec des vitesses de dévidage plus élevées,

les risques de présence de bouts mous et de rupture de la pélette sont dus au taux plus élevé auquel les filaments de cocons se déroulent à partir des cocons et cela entraîne donc des problèmes de fil. De plus, lorsque la vitesse de dévidage augmente, la longueur de la soie grège dévidée par unité de temps augmente et donc le nombre de problèmes de fil par unité de temps augmente. Le taux de présence de problèmes de fil pendant le dévidage est l'un des paramètres importants qui doit être pris en considération pour fixer la vitesse de dévidage.

#### **Caractéristiques de qualité de la soie grège :**

Les résultats moyens concernant l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur les caractéristiques de qualité de la soie grège sont présentés dans les Tableaux III et IV. L'analyse de variance des caractéristiques de qualité est présentée dans le Tableau V.

#### **Netteté et netteté minimum de la soie grège :**

Les résultats indiquent (Tableau III) que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la netteté et la netteté minimum de la soie grège diminuent. La faible vitesse de dévidage, en association avec la méthode de cuisson pressurisée, donne significativement de meilleures netteté et netteté minimum de la soie grège, par comparaison à la cuisson ouverte à la bassine. Cela est dû aux meilleurs gonflement et amollissement de la séricine aux points de croisement du filament dans la coque soyeuse dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée.

On observe d'après les résultats de l'analyse de variance (Tableau V) que l'influence de la méthode de cuisson des cocons sur la netteté et sur la netteté minimum de la soie grège est significative au seuil de 1 %. Cependant, l'influence de la vitesse de dévidage sur la netteté et sur la netteté minimum de la soie grège n'est pas significative.

#### **Propreté de la soie grège :**

On observe (Tableau III) que la méthode de cuisson des cocons et que la vitesse de dévidage ont une influence significative sur la propreté de la soie grège. L'influence de la méthode de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la propreté de la soie grège est significative au seuil de 1 % (Tableau V).

Les résultats indiquent que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la propreté de la soie grège baisse significativement. Cela est dû au fait que lorsque la vitesse de dévidage augmente, le taux de déroulement du filament et la tension de dévidage augmentent. Les vitesses de dévidage élevées augmentent les risques de présence de boucles dans la soie grège et un nombre plus important de points de croisement se déroulent sans se détendre pendant le dévidage, ce qui entraîne la formation de défauts de propreté (boucles / petits bouchons / bouts mous) dans le fil dévidé. Une vitesse de dévidage lente associée à une méthode de cuisson pressurisée donne significativement une meilleure propreté de la soie grège par comparaison aux autres conditions.

La méthode de cuisson pressurisée donne significativement une meilleure propreté de la soie grège par comparaison à la méthode de cuisson ouverte à la bassine pour toutes les vitesses de dévidage. On attribue cela au gonflement et à l'amollissement meilleurs et uniformes de la séricine aux points de croisement du filament dans la coque soyeuse, dans le cas de la cuisson pressurisée des cocons.

#### **Tension de dévidage :**

La figure 4 indique que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la tension de dévidage augmente significativement. On observe aussi que la méthode de cuisson pressurisée donne significativement une tension de dévidage plus basse, par comparaison à la méthode de cuisson ouverte à la bassine, pour toute la fourchette de vitesses. Les résultats indiquent que l'influence de la méthode de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la tension de dévidage est significative au seuil de 1 % (Tableau V).



On attribue la tension de dévidage significativement moins importante, dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée, à l'amollissement meilleur et uniforme de la séricine aux points de croisement du filament du cocon. On peut attribuer la tension de dévidage plus élevée, dans le cas de la méthode de cuisson ouverte à la bassine, par comparaison à la méthode de cuisson pressurisée, au manque de ramollissement de la séricine des couches de filament du cocon.

L'augmentation de la tension de dévidage lorsque la vitesse de dévidage augmente est due à l'augmentation du mouvement d'oscillation des cocons pendant le dévidage, ce qui entraîne une variation de l'angle d'exfoliation du filament du cocon et donc de la tension d'exfoliation, ce qui entraîne la variation / l'augmentation de la tension de dévidage totale (Takabayashi, 1993). De plus, comme on l'a précisé plus haut, les cocons se rapprochent entre eux dans la bassine de dévidage, ce qui augmente la friction entre les surfaces des cocons, ce qui entraîne l'augmentation de la tension de dévidage. Nakagawa a mis au point une équation liée à la vitesse de dévidage et à la tension de dévidage, qui est la suivante (Takashi Omura, 1981).

$$T = A + d V^n$$

Où  $T$  = Tension de dévidage de la soie grège (g / 10 deniers)  
 $A$  = Tension sans tenir compte de la vitesse de dévidage de la soie ( g / 10 deniers)  
 $d$  = Coefficient de vitesse (g / 10 deniers)  
 $V$  = Vitesse de dévidage de la soie (m / min)  
 $n$  = Exposant de vitesse

#### Résistance de la soie grège :

On observe (Tableaux IV et V) que la condition de cuisson des cocons et que la vitesse de dévidage ont toutes les deux une influence significative (au seuil de 1 %) sur la résistance de la soie grège. La méthode de cuisson pressurisée donne une meilleure résistance de la soie grège par comparaison à la méthode de cuisson ouverte à la bassine. On pourrait attribuer cela aux meilleurs gonflement et ramollissement de la séricine aux points de croisement du filament dans les cocons, dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée, par comparaison à la sous-cuisson / au manque de cuisson des cocons, dans le cas de la méthode ouverte à la bassine. Cela est aussi dû à la dissolution plus importante de la séricine pendant la cuisson, dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée, par comparaison à la méthode de cuisson ouverte à la bassine, ce qui entraîne une baisse du denier et donc une augmentation de la résistance de la soie grège.

Les résultats indiquent que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la résistance de la soie grège augmente. Cela est dû au fait que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la tension de dévidage augmente (Figure 4), ce qui entraîne l'orientation des fibrilles dans la fibroïne du filament du cocon. On peut supposer que la meilleure orientation des fibrilles dans la fibroïne augmente la résistance de la soie grège.

#### Allongement de la soie grège :

Les résultats de l'analyse de variance (Tableau V) indiquent que l'influence de la méthode de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur l'allongement de la soie grège est significative au seuil de 1 %. On observe que la méthode de cuisson pressurisée donne significativement un meilleur allongement de la soie grège par comparaison à celui obtenu avec la méthode de cuisson ouverte à la bassine (Tableau IV). On peut attribuer cela au gonflement et au ramollissement meilleurs et uniformes de la séricine aux points de croisement et de toutes les couches du filament de la coque soyeuse. On attribue la diminution significative de l'allongement de la soie grège dans le cas de la méthode de cuisson ouverte à la bassine à la sous-cuisson des cocons. Il faut noter que la sous-cuisson des cocons augmente la tension d'exfoliation du filament de cocon, ce qui, à son tour, augmente la tension totale de dévidage (Subhas, 1996). Une tension de dévidage plus élevée semble avoir affecté l'allongement de la soie grège.

D'après le Tableau IV, on observe que lorsque la vitesse de dévidage augmente, l'allongement de la soie grège baisse de manière significative. On peut attribuer cela au fait que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la tension de dévidage augmente, ce qui entraîne l'orientation des fibrilles dans la fibroïne du filament du cocon, ce qui diminue, par là même, l'allongement de la soie grège.

#### **Cohésion de la soie grège :**

On observe (Tableau IV) que la condition de cuisson des cocons et la vitesse dévidage ont toutes les deux une influence significative sur la cohésion de la soie grège. L'influence de la méthode de cuisson des cocons et de la vitesse de dévidage sur la cohésion de la soie grège, est significative au seuil de 1 % (Tableau V).

La méthode de cuisson pressurisée donne significativement une meilleure cohésion de la soie grège par comparaison à la méthode ouverte à la bassine. Cela est dû au gonflement et ramollissement uniformes et meilleurs de la sérécine des couches du filament de cocons dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée. On doit noter que l'agglutination correcte des filaments dans le fil de soie grège ne se produit que si la sérécine des couches du filament de cocon est correctement amollie. On attribue la diminution de la cohésion de la soie grège, dans le cas de la méthode de cuisson ouverte à la bassine, au sous ramollissement / au manque de ramollissement de la sérécine. Les résultats indiquent que pour obtenir une bonne cohésion de la soie grège, et obtenir le gonflement et le ramollissement de la sérécine des couches du filament du cocon au niveau requis, il est essentiel de cuire efficacement les cocons.

Les résultats indiquent que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la cohésion de la soie grège augmente. On peut attribuer cela au fait, que lorsque la vitesse de dévidage augmente, la tension de dévidage augmente de manière significative (Figure 4). Cela contribue à augmenter l'agglutination entre les filaments de cocon pendant le dévidage et cela augmente donc la cohésion de la soie grège. Il faut noter que, lorsque la tension de dévidage augmente la friction entre les deux fils dans la partie de la croisure augmente, ce qui entraîne l'augmentation de l'agglutination entre les filaments de cocon.

### **CONCLUSION**

La condition de cuisson des cocons et la vitesse de dévidage ont une influence significative sur la performance de dévidage et sur la qualité de la soie grège. Les résultats indiquent que des vitesses de dévidage très lentes (50 ~70 m / min) donnent de meilleures dévidabilité, rentrée de soie grège et qualité de soie. On doit noter que le dévidage à une vitesse lente diminue significativement la productivité par unité de durée. Tandis que les vitesses de dévidage élevées (au-dessus de 130 m / min) peuvent augmenter la productivité par unité de durée jusqu'à une certaine fourchette, mais elles diminuent la dévidabilité et la rentrée de soie grège et affectent significativement la qualité de la soie grège. La cuisson des cocons au niveau optimum et la sélection de la vitesse de dévidage optimale, en fonction de la productivité et de la catégorie de soie grège visées, sont donc des conditions essentielles pour obtenir de meilleurs résultats sur le plan technico-économique.

Pour atteindre de meilleurs résultats sur le plan technico-économique, dans les conditions indiennes, il est essentiel de produire 1 kg de soie grège par bassine (10 extrémités) par personne par période de 8 heures. On recommande donc, d'après les résultats, une vitesse de dévidage de 90 m / min ~ 110 m / min., dans le cas d'une machine de dévidage multibouts du CSRTI, pour obtenir une production de soie de qualité avec un rendement et une production optimales, à partir de cocons polybivoltins.

## INTERCROPPING AMARANTH WITH MULBERRY FOR MANAGING ROOT-KNOT NEMATODES AND IMPROVING SERICULTURE

SUBHAS CHANDRA DATTA<sup>1\*</sup> & RUPA DATTA (NAG)<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Life Science Unit, Ajodhya High School, Bankati, Via-Panagarh, Burdwan-713148 and Eco-Club Research Unit, Kanchannagar D. N. Das High School, Kanchannagar, Burdwan-713102, West Bengal, India.

<sup>2</sup>Burdwan Model School, Dewandighi, P.O.- Mirjapur, Burdwan-713102, West Bengal, India.

*In a field (0.72ha) naturally-infested with Meloidogyne incognita, Kofoid & White, Chitwood, amaranth was intercropped with mulberry to determine the effects on nematode populations and quality of mulberry leaves for silkworm production. The nematode population varied from 1579-1632 per 200g of soil and 820-955 per 2g of roots. The fields were divided into two groups and each group had six plots. The plots were: monoculture plots and intercropped plots. Amaranth were planted between the rows every two mulberry plants in the intercropped plots. Silkworm larvae were fed with the mulberry leaves of monoculture and intercropped plots. Of the two plant species, amaranth receives maximum infection of root-knot disease. Silkworm larvae fed on the leaves of intercropped plots showed improved growth, shell weight and shell ratio, 2% mortality rate and received fewer feeding to cocoon formation. These results suggest that root-knot disease easily and effectively controlled by the use of amaranth plants as "trap crop" for root-knot nematodes intercropped with mulberry plants in the naturally root-knot infested mulberry field; this method could increase silk production and it would not only be easier way, and not only would it be the earnest and cheapest way, but also it would conserve our biodiversity.*

**Keywords:** Intercropping, Amaranth, Mulberry, Managing, Root-knot, Sericulture.

### INTRODUCTION

Root-knot nematodes reduce plant growth, leaf yield and leaf-protein content of mulberry significantly. Moreover the use of pesticides cause the problem of residual toxicity in the treated plants which results in reduced palatability of the leaves to the feeding silkworm larvae, reduction in growth of the larvae and also in silk production (Datta *et al.*, 1997, 2000; Datta, 2005a,b, 2006a,b, 2007; Datta and Datta, 2006a). Root-knot disease caused by this plant parasitic nematodes are among the most devastating pathogen of food, cash and fiber crop, causing an estimated 77 billion dollar crop losses annually and the majority of the losses is caused by root-knot nematodes (Sasser and Freckman, 1986). And indiscriminate use of plant resources for nematode control has also created problem for bio-diversity conservation (Halfer, 1996). There are many bio- pesticides including the

---

\* **Corresponding Postal address :** Dr.Subhas Chandra Datta, Researcher & Headmaster, C/O- Rajendranath Nag, Bajeprotappur (Katwa Road), P.O. & DT. – Burdwan, Pin – 713101, West Bengal, India. **Telephone No.:** Office- 0342-2628135    Residence- 0342-2622097,    Fax No. : 0091-342-2624263. E-mail: dattasubhas@rediffmail.com



homeopathic medicine *Cina* which effectively control root-knot disease but create problems (Datta, 1999; 2005a,b; 2006a,b, 2007; Datta and Datta, 2006a,b).

To overcome these situations, as it has been observed from previous pot experiment that amaranth (*Amaranthus viridis* L., cv. CO-1) is more susceptible than mulberry (*Morus alba* L., cv. 'S<sup>1</sup>') for root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*, Kofoid & White, Chitwood), it was tested for possible use as catch crop (Datta, 2005b). A field trial, was planned in order to further confirm the use of amaranth (*A. viridis* L., cv. CO-1) as "trap crop" for root-knot nematodes intercropped with mulberry (*M. alba* L., cv. 'S<sup>1</sup>') in the naturally root-knot infected field condition and also to find out the effects of mulberry leaves of intercropped plants field on the leaf consumption and growth of silkworm larvae (*Bombyx mori* L.).

## MATERIALS AND METHODS

### Location of the field trial and silkworm rearing:

The field experiment was carried out at the Sriniketan Sericultural Composite Unit, Government of West Bengal, ( $28 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ,  $75 \pm 5\%$  RH, pH 5.8) naturally-infested with root-knot disease. Soil and root samples (Christie and Perry, 1951; Chatterjee and Sukul, 1981; Sukul, 1987; Datta, 2005a, 2007) were taken at random from 6 month old mulberry plantation stretching over an area of 5.6 acres of land with a view to determining the extent and intensity of *M. incognita* infestation at the beginning of the experiments in order to start the treatments with the same population levels. The initial nematode populations were  $1579 \pm 53$  J<sub>2</sub> per 200g of soil and  $820 \pm 135$  J<sub>2</sub> per 2g of root. Soil was interchanged among the plants to keep the nematode infestation as uniform as possible in the naturally infected field. It appears that nematodes distributes themselves equally in soil and root system. Total area of 0.72ha of mulberry field were demarcated as experimental area which was divided into two groups. Each group was given six plots, each measuring 0.02 ha (First group 240 mulberry plants/plot and second group 120 mulberry plants/plot) and the field trial was replicated three times in the demarcated land. These experimental fields were randomized in the infested field by using a completely randomized block design. All the data were counted for statistical analysis by the analysis of variance (ANOVA).

### Preparation of field:

At first all the plants were pruned, manured with NPK and irrigated every day (Datta *et al.*, 1997; Datta, 2005a, 2007; Datta and Datta, 2006a,b). Before plantation of aseptically germinated seeds of amaranth cv. CO-1, rhizospheric soil was interchanged among the plants to keep the nematode population as uniform as possible in the soil, and the root systems of the two plant species. Aseptically germinated seeds of amaranth cv. CO-1 were planted between the rows of every two mulberry plant cv. 'S<sup>1</sup>' in the second group of six plots; then, due to this practice there were total 240 plants/plot (120-mulberry and 120-amaranth/plot). The experiment was replicated thrice in the demarcated fields. The plants were allowed to grow for a period of 105 days when all the amaranth plants were uprooted and the disease were assessed again. Soil and root samples were taken at random from all the experimental plots. *M. incognita* population were estimated in the rhizospheric soil as well as roots of plant (Christie and Perry, 1951; Chatterjee and Sukul, 1981; Sukul, 1987; Datta, 2005a, 2007). Numbers of leaves and of root galls per plant were counted (Chatterjee and Sukul, 1981; Datta 2005a, 2006a,b, 2007; Datta and Datta, 2006a,b). The total protein content of the fresh leaf and root samples (fresh weight) from all the plots were determined (Lowry *et al.*, 1951; Chatterjee and Sukul, 1981). All the data were counted for statistical analysis by ANOVA.

### Rearing of silkworms:

The rearing of silkworms were carried out in the rearing house at the Sriniketan Sericultural Composite Unit, Government of West Bengal, India. Eggs of multivoltine 'Nistari' race supplied by

Regional Sericultural Research and Training Institute, Berhampore-742101, India, after hatching and brushing, were divided into two groups (230 silkworms/batch) and the larvae were kept inside a rearing chamber ( $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $70 \pm 5\%$  RH) (Krishnaswamy *et al.*, 1972; Govindaiah and Sharma, 1994; Datta *et al.*, 1997, Datta, 1999, 2005a, 2006a,b, 2007; Datta and Datta, 2006a,b). The experimental groups were replicated thrice. Leaves were used for feeding 30 days after the pruning of mulberry and plantation of amaranth plant. The larvae of one batch were fed with the mulberry leaves of monoculture (infected mulberry) plots and those of the second batch with the leaves of intercropped (infected mulberry-amaranth) plots. The weight of the larvae and that of the leaves were recorded daily until the larvae started spinning. The silk percentage (Shell weight/Cocoon weight  $\times$  100) was determined. All the data were counted for statistical analysis by the student's t-test.

## RESULTS

Table I shows the use of amaranth as trap crop for *M. incognita* intercropped with mulberry on naturally *M. incognita* infested mulberry field ( $P < 0.01$  by ANOVA). Intercropped plots of mulberry showed higher protein content in leaves and roots. While *M. incognita* population increased significantly both in soil as well as in roots in 105 days in the monoculture fields of mulberry plants, the population decreased significantly in soil and roots of intercropped fields of mulberry plants during the same period. The number of root galls of mulberry also decreased significantly in the intercropped plots. But amaranth showed the highest intensity of nematode infection. The same results which were obtained from three replicates and all the data were considered for statistical analysis.

Table II shows the effects on feeding silkworms and increased silk production for commercial purpose ( $P < 0.05$  by 't' test). The average consumption of leaves by the 5<sup>th</sup> instars was less for intercropped plots of mulberry plants than for monoculture ones. Furthermore, the average fresh weight of the 5<sup>th</sup> instars, and also of the cocoon and shell weight were higher with the intercropped plots of mulberry plants than with the monoculture ones. The shell ratio (Shell weight/Cocoon weight  $\times$  100) was also higher with intercropped plots of mulberry plants than with monoculture ones. On the other hand, the mortality rate was less (2%) with the intercropped plots of mulberry plants in comparison to 30% with the monoculture ones.

## DISCUSSION

Not only did amaranth plants intercropped with mulberry reduce root-knot nematode populations (Datta *et al.*, 2000; Datta, 2005a,b, 2006b), but they also improved the nutritive value of the mulberry leaves. This higher nutritive value contributed to greater growth and survivorship of the silkworm larvae which increased silk production significantly for commercial purpose (Datta *et al.*, 1997; Datta, 2005a, 2006a, 2007; Datta and Datta, 2006a,b). The improved health of the larvae from the intercropped mulberry leaves feeding group resulted in a lower mortality rate (2%). It has been already observed that the amaranth was highly susceptible to root-knot nematodes in comparison to mulberry (Datta *et al.*, 2000; Sukul *et al.*, 2001; Datta, 2005a,b, 2006a,b, 2007; Datta and Datta, 2006a, b). This does not mean that mulberry are resistant to root-knot nematodes. Rather mulberry is a very good host of this nematodes. However, root-knot nematodes preferred to feed on amaranth rather than mulberry when it had a choice and the relative size of the two root systems and biomass of roots is what really makes the difference in susceptibility between the two plants (Datta, 2005a, b, 2006a, b, 2007; Datta and Datta, 2006a,b). It is also observed that amaranth was more susceptible to nematodes than other plants, and next were cucumber, cowpea, lady's finger and mulberry in order of the degree of susceptibility (Datta *et al.*, 2000; Datta, 2005a, b, 2006b, 2007; Datta and Datta, 2006a, b). Since amaranth root system occupies and colonizes a large area, it is likely that the plant parasitic nematodes prefer its roots (Datta *et al.*, 2000; Datta, 2005a, b, 2006b, 2007; Datta and Datta, 2006a,b). It is already confirmed that planting other plants, different from amaranth, did not result in a reduction of

mulberry infestation (Datta *et al.*, 2000; Datta, 2005a,b, 2006b, 2007; Datta and Datta, 2006a,b). During the experiment, soil was interchanged among the plants to keep the nematode infestation as uniform as possible in the naturally infected field (Datta *et al.*, 1997; Datta, 2005a,b, 2006a,b, 2007). It appears that nematodes distribute themselves equally in soil and root system.

One can assume that the experiment may not have been conducted for a period of time long enough to observe the negative impact of intercropping amaranth with mulberry. Because amaranth is such a good host for nematode, it will eventually lead to extremely high nematode populations which may damage the mulberry. For this reason, all the amaranth plants were harvested or uprooted after 105 days.

**Table I. Use of amaranth plants as trap crop for *M. incognita* intercropped with mulberry plants in a field.**

**Tableau I. Utilisation de plants d'amarante, comme culture piège de *M. incognita*, en interculture avec des plants de mûrier dans un champ.**

Treatment Group* (6 plots / group & 240 plants / plot )	Number of leaves / plant* +	Protein content fresh		Nematode population **		Number of root galls/ plant **
		Leaf	Root	Soil (200g)	Root (2g)	
Groupe de traitement* (6 parcelles / groupe et 240 plants / parcelle)	Nombre de feuilles / plant**	Teneur en protéines (p. frais)		Population de nématodes **		Nombre de galles de la racine / plant **
		Feuille	Racine	Sol (200 g)	Racine (2 g)	
<b>Monoculture</b> (Infected Mulberry) (Mûrier infesté)	230a ± 4.10	2.96a ± 0.03	4.36a ± 0.02	2428a ± 60.70	2014b ± 35.96	1052b ± 15.93
<b>Intercropped / Interculture</b> (Infected Mulberry- Amaranth) (Mûrier infesté - Amarante)	432b ± 6.54	6.76b ± 0.07	7.84b ± 0.09	75b ± 1.63	103c ± 1.83 4539a ± 80.91	204c ± 2.68 99901a ± 131.44

\* 'a, b' Significantly different values by ANOVA (P < 0.01) in the same column. / Valeurs significativement différentes d'après l'ANOVA (P < 0,01) dans la même colonne.

\* Field trial was replicated thrice / On répète l'essai sur le terrain trois fois.

+ Average values of 10 samples in triplicate from each plot. / Valeurs moyennes pour 10 échantillons en triple exemplaire provenant de chaque parcelle.



**Table II. Effects of *M. incognita* infested monoculture and intercropped plots of mulberry plants in a field on the feeding and growth of silkworms.***Tableau II. Effets de l'infestation de la monoculture et des parcelles intercalées de plants de mûrier par M. incognita dans un champ sur l'alimentation et la croissance des vers à soie.*

Treatment batches* (230 no./batch)	Consumption of leaves f. wt* (g) (g / larve)	Larval f. weight*+ (g)	Cocoon f. Weight (g)*+	Shell f. Weight (g)*	Shell ratio (SR%)*+	No. of feeding to cocoon formation*	Mortality rate (%)**+
<i>Lots de traitements*</i> (230 / lot)	<i>Consommation de feuilles p. f. (g) (g / larva)</i>	<i>Poids f. de la larve **+</i> (g)	<i>Poids f. du cocon*+</i> (g)	<i>Poids f. de la coque (g)*</i>	<i>Richesse soyeuse (% RS) **+</i>	<i>Nbre de repas jusqu'à la formation du cocon *</i>	<i>Taux de mortalité (%)**+</i>
<b>Monoculture</b> (Infected Mulberry Mûrier infesté)	3.62a	1.56a	0.88a	0.12a	13.63a	75a	30a
<b>Intercropped / Interculture</b> (Infected Mulberry- Amaranth / Mûrier infesté – amarante)	2.37b ± 0.05	2.53b ± 0.05	1.11b ± 0.02	0.18b ± 0.01	16.22b ± 0.27	65b ± 2.24	2b ± 0.01

'a, b' - Different small letters in the same column show significant difference ( $P < 0.05$ ) by 't'- test among the values. / Des lettres minuscules différentes dans la même colonne montrent une différence significative. ( $P < 0,05$ ) d'après le test "t" entre les valeurs.

\* Silkworms rearing trial was replicated three times. / On répète le test d'élevage des vers à soie trois fois.

'+' Average values of 10 samples in triplicate from each batch. / Valeurs moyennes pour 10 échantillons en triple exemplaire provenant de chaque lot.

These results once again suggest that plant disease may be easily and effectively controlled by the use of amaranth plants as 'trap crop' for root-knot nematodes intercropped with mulberry plants in the naturally root-knot infested mulberry field; this method commercially increases silk production (Datta, 2005a,b, 2006a,b, 2007) and it would be easy way, cheap, non-phytotoxic and non-pollutant but it also conserves our biodiversity. The farmers would be double benefited by buying and selling the edible amaranth plant regularly. It should be harvested at frequent intervals to keep the nematode population to a minimum level in the root-knot nematodes infested fields.

It may be concluded that the use of intercropped edible amaranth plants can serve as good 'trap crops' for plant parasitic nematodes in all kinds of vegetables and cash crops where chemical control poses serious health hazard to man and many economically important larvae, herbivores, soil micro and macro- fauna due to residual toxicity in leaves and soil; this method enriches sericulture as well as agricultural economy without disturbing biosphere.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank, Retd. Prof. Nirmal Chandra Sukul and Dr. Santi Prasad Sinhababu of Department of Zoology, and Prof. Sukanta Sen and Dr. Nirmalya Banerjee of Department of Botany, Visva-Bharati

University, Santiniketan – 731235 and the Joint Director of Sriniketan Sericultural Composite Unit, Government of West Bengal for necessary facilities and helps. Lastly, we are immensely indebted to Mr. Achintya Mondal, Secretary of ORIENTAL ASSOCIATION FOR EDUCATION AND RESEARCH, BIMS, BMS, OIST & BIMLS, West Bengal, India and Dr. Tapan Mondal and Mr. Ashis Mondal of Ajudhya High School for statistical analysis.

## REFERENCES

- CHATTERJEE A., SUKUL N.C. (1981) Total protein of galled roots as an index of root-knot nematode infestation of lady's finger plants. *Phytopathol.*, 71, 372-274.
- CHRISTIE J.R., PERRY V.G. (1951) Removing nematodes from soil. *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 18, 106-108.
- DATTA S.C. (2005a). Plant parasitic nematodes – an agricultural problem and its solutions. *Visva-Bharati Quarterly*, 11 (3&4), 89- 100.
- DATTA S.C. (2005b) Possible use of amaranth as catch crop for root- knot nematodes intercropped with mulberry. *J. Environ. & Sociobiol.*, 2 (1&2), 61-65.
- DATTA S.C. (2006a) Effects of *Cina* on root-knot disease of mulberry. *Homeopathy*, 95 (2), 98-102.
- DATTA S.C. (2006b) Possible use of amaranth as catch crop for root-knot nematodes intercropped with okra. *Phytomorph.*, 56 (3&4), 113-116.
- DATTA S.C. (2007) Mulberry disease: a problem in sericulture. *SEBA NEWSLETTER*, 4 (1), 7-10.
- DATTA S.C. (1999) Bio-nematicides in the control of root-knot nematode. Ph.D. thesis, Department of Zoology, Visva-Bharati, Santiniketan-731235, West Bengal, India (Unpublished).
- DATTA S.C., DATTA R. (2006a) Liquid homeopathic medicine *Cina* enriches sericulture industry. *J. Environ. & Sociobiol.*, 3 (1), 55-60.
- DATTA S.C., DATTA R. (2006b) Defense resistance of okra against root-knot disease by bio-nematicides. *Proc. Zool. Soc., Calcutta*, 59 (2), 221-228.
- DATTA S.C., SINHABABU S.P., SUKUL N.C. (1997) Improved growth of silkworms from effective treatment of mulberry diseases by *Acacia auriculiformis* extract. *Sericologia*, 37(4), 707-712.
- DATTA S.C., DATTA R., SUKUL A., SUKUL N.C., SINHABABU S.P. (2000) Relative attractiveness of four species of vegetable crops for *Meloidogyne incognita*. *Environ. and Ecol.*, 18, 233-235.
- GOVINDAIAH, SHARMA D.D. (1994). Root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting mulberry - a review. *Indian J. Seric.*, 33(2), 110-113.
- HALFER G. (1996) Bio-diversity conservation and protected areas in tropical countries. In: DiCastrì F., Younis T. editors. *Biodiversity of Science and Development Towards a New Partnership*. USA : AB Inter. in associated with IUBS, pp.212-223.
- KRISHNASWAMY S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYANA S.K., KUMARARAJ S. (1972) *Manual on sericulture*, Vol. 2 Silkworm rearing. *Agric. Services Bull.* 15, FAO, Rome.
- LOWRY O.H., ROSSEBROUGH N.J., FARR A.R., RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- SASSER, J.N., FRECKMAN D.W. (1986) Crop protection : systemic and persistent effect of neem. *Proc. of 25<sup>th</sup> Ann. Meet. Soc. Nemat.*, Orlando, Florida, p.32.
- SUKUL N.C. (1987) *Soil and plant nematodes*. West Bengal State Book Board Publisher, Calcutta, 271pp.
- SUKUL N.C., SINHABABU S.P., DATTA S.C., NANDI B., SUKUL A. (2001) Nematotoxic effect of *Acacia auriculiformis* and *Artemisia nilagirica* against root-knot nematodes. *Allelopt. J.*, 8, 65-72.

## INTERCULTURE DE L'AMARANTE AVEC LE MURIER POUR LUTTER CONTRE LES NEMATODES DE LA GALLE DE LA RACINE ET AMELIORER LA SERICICULTURE

SUBHAS CHANDRA DATTA<sup>1\*</sup> & RUPA DATTA (NAG)<sup>2</sup>

1. Life Science Unit, Ajodhya High School, Bankati, Via-Panagarh, Burdwan -713 148 & Eco-Club Resarch Unit, Kangchannagar D. N. Das High School, Kanchannagar, Burdwan -713 102, West Bengale, Inde.
2. Burdwan Model School, Dewandighi, P. O. Mirjapur, Burdwan – 713 102, West Bengale, Inde.

*On a procédé à une interculture d'amarante avec du mûrier dans un champ naturellement infesté (0,72 ha) par **Meloidogyne incognita**, Kofoid & White, Chitwood pour déterminer les effets sur la population de nématodes et sur la qualité des feuilles de mûrier pour la production de vers à soie. La population de nématodes varie de 1579 à 1632 pour 200 g de sol et de 820 à 955 pour 2 g de racines. On divise les champs en deux groupes et chaque groupe comporte six parcelles. Les parcelles sont des parcelles de monoculture et des parcelles avec des intercultures. On plante de l'amarante entre les rangées tous les deux plants de mûrier dans les parcelles d'intercultures. On nourrit les larves de vers à soie avec des feuilles de mûrier provenant des monocultures et des parcelles d'intercultures. Des deux espèces de plantes, l'amarante reçoit l'infestation maximum du nématode de la racine. Les larves de vers à soie qui se nourrissent à partir de parcelles d'intercultures présentent une amélioration de leur croissance, du poids de leur coque et de leur richesse soyeuse, un taux de mortalité de 2 % et ont besoin de moins de repas jusqu'à la formation des cocons. Ces résultats suggèrent qu'on peut lutter facilement et efficacement contre la maladie de la galle de la racine par l'utilisation de plants d'amarante comme « culture piège » des nématodes de la racine, en interculture avec des plants de mûrier, dans une muraille naturellement infestée par le nématode de la racine ; cette méthode permet non seulement d'améliorer la production de soie mais elle représente aussi une alternative plus facile, plus sérieuse et meilleur marché qui permet aussi de conserver notre biodiversité.*

### INTRODUCTION

Les nématodes de la galle de la racine réduisent la croissance de la plante, le rendement foliaire et la teneur en protéines du mûrier de manière significative. De plus, l'utilisation de pesticides pose le problème de toxicité résiduelle chez les plantes traitées, ce qui a pour conséquence une diminution de la comestibilité des feuilles pour les larves de vers à soie qui s'en nourrissent, la diminution de la croissance des larves et aussi de la production de soie (Datta et coll., 1997, 2000 ; Datta, 2005a, b, 2006a, b, 2007 ; Datta et Datta, 2006a). La maladie de la galle de la racine provoquée par des nématodes parasites de cette plante sont parmi les nématodes les plus dévastateurs des cultures

\* Adresse de correspondance postale: Dr.Subhas Chandra Datta, Researcher & Headmaster, C/O-Rajendranath Nag, Bajeprotappur (Katwa Road), P.O. & DT. – Burdwan, Pin – 713101, West Bengal, India. Telephone No.: Office- 0342-2628135 Residence- 0342-2622097, Fax No. : 0091-342-2624263. E-mail: dattasubhas@rediffmail.com



vivrières, commerciales et textiles, qui entraînent des pertes de récoltes estimées à 77 milliards de dollars annuellement et la majorité des pertes est due aux nématodes de la racine (Sasser et Freckman, 1986). L'utilisation indiscriminée de ressources de plantes pour lutter contre le nématode a aussi créé un problème de conservation de la biodiversité (Halfer, 1996). Il existe de nombreux bio-pesticides dont le médicament homéopathique Cina, qui lutte efficacement contre la maladie du nématode de la racine mais crée des problèmes (Datta, 1999 ; 2005a, b ; 2006a, b, 2007 ; Datta et Datta, 2006a, b).

Pour surmonter ces situations, comme on a observé à partir d'expériences précédentes en pot, que l'amarante (*Amaranthus viridis* L., cv. CO-1) est plus sensible que le mûrier (*Morus alba*, cv. S<sup>1</sup>) aux nématodes de la galle de la racine (*Meloidogyne incognita*, Kofoid & White, Citwood), nous l'avons testée pour l'utilisation éventuelle comme culture piège (Datta, 2005b). Nous avons programmé un essai sur le terrain pour obtenir une confirmation supplémentaire de l'utilisation de l'amarante (*A. viridis* L., cv. CO-1), cultivée de manière intercalée avec le mûrier (*M. alba* L., cv. S<sup>1</sup>) dans des champs naturellement infestés par le nématode de la racine, comme « culture piège » pour les nématodes de la galle de la racine et aussi pour déterminer quels sont les effets des feuilles de mûrier provenant des plants intercalés, sur la consommation de feuilles et la croissance des larves de ver à soie (*Bombyx mori* L.).

## MATERIELS ET METHODES

### Lieu de l'essai sur le terrain et de l'élevage du ver à soie :

On réalise l'expérience sur le terrain au *Sriniketan Sericultural Composite Unit*, du Gouvernement du Bengale ouest ( $28 \pm 5^\circ$  C,  $75 \pm 5\%$  d'HR, pH de 5,8), infesté de manière naturelle par la maladie du nématode de la racine. On prend des échantillons de sol et de racine (Christie et Perry, 1951 ; Chatterjee et Sukul, 1981 Sukul, 1987 ; Datta, 2005a, 2007) au hasard sur une plantation de mûriers de 6 mois, s'étendant sur une surface de 5,6 acres de terrain, dans le but de déterminer le degré et l'intensité de l'infestation par *M. incognita* au début des expériences, pour commencer les traitements avec les mêmes niveaux de population. Les populations initiales de nématodes sont de  $1579 \pm 53$  J2 pour 200 g de sol et de  $820 \pm 135$  J2 pour 2 g de racines. On échange le sol entre les plants pour garder l'infestation par les nématodes aussi uniforme que possible dans le terrain naturellement infesté. Il apparaît que les nématodes se distribuent eux-mêmes de manière égale entre le sol et le système racinaire. On délimite la zone totale de 0,72 ha de muraies comme une zone expérimentale et on la divise en deux groupes. On accorde six parcelles à chaque groupe, mesurant chacune 0,02 ha (premier groupe de 240 plants de mûrier / parcelle et deuxième groupe de 120 plants de mûrier / parcelle) et on répète l'essai trois fois sur le terrain délimité. On répartit au hasard ces parcelles expérimentales dans le champ infesté en utilisant une conception aléatoire en blocs. On comptabilise toutes les données pour l'analyse statistique d'après l'analyse de variance (ANOVA).

### Préparation du terrain :

En premier lieu, on taille tous les plants, on les entretient avec du NPK et on les irrigue chaque jour (Datta et coll., 1997 ; Datta, 2005a, 2007 ; Datta et Datta, 2006a, b). Avant la plantation de graines ayant germé de manière aseptisée du cv. CO-1 d'amarante, on échange le sol de la rhizosphère entre les plants pour conserver la population de nématodes aussi uniforme que possible dans le sol et dans les systèmes racinaires des deux espèces de plantes. On plante les graines ayant germé de manière aseptisée du cv. CO-1 d'amarante entre les rangées tous les deux plants de mûrier du cv. « S<sup>1</sup> » dans le deuxième groupe de six parcelles ; puis, compte tenu de cette pratique, on obtient un ensemble de 240 plants / parcelle (120 de mûriers et 120 d'amarantes / parcelle). On répète l'expérience trois fois dans les terrains délimités. On laisse les plants pousser pendant une période de 105 jours, après laquelle on déracine tous les plants d'amarante et on évalue à nouveau la maladie. On prend des échantillons de sol et de racine au hasard dans toutes les parcelles expérimentales. On estime la population de *M. incognita* dans le sol de la rhizosphère ainsi que sur les racines des plants (Christie et Perry, 1951 ;

Chatterjee et Sukul, 1981 ; Sukul, 1987 ; Data, 2005a, 2007). On compte le nombre de feuilles et de galles de la racine par plant (Chatterjee et Sukul, 1981 ; Datta 2005a, 2006a, b, 2007 ; Datta et Datta, 2006a, b). On détermine la teneur totale en protéines de la feuille fraîche et des échantillons de racine (poids frais) provenant de toutes les parcelles (Lowry et coll., 1951 ; Chatterjee et Sukul, 1981). On comptabilise toutes les données pour l'analyse statistique par l'ANOVA.

#### **Elevage des vers à soie :**

On procède à l'élevage des vers à soie dans la magnanerie au *Sriniketan Sericultural Composite Unit*, du gouvernement du Bengale ouest, en Inde. On divise les œufs de la race polyvoltine « Nistari » fournis par le *Regional Sericultural Research and Training Institute*, de Berhampore -742 101, en Inde, après l'éclosion et la levée, en deux groupes (230 vers à soie / lot) et on conserve les larves à l'intérieur d'une pièce d'élevage ( $27 \pm 2^\circ \text{C}$  et  $70 \pm 5\%$  d'HR) (Krisnaswamy et coll., 1972 ; Govindaiah et Sharma, 1994 ; Datta et coll., 1997, Datta, 1999, 2005a, 2006a, b, 2007 ; Datta et Datta, 2006a, b). On fait trois répétitions des groupes expérimentaux. On utilise les feuilles pour les repas 30 jours après avoir taillé le mûrier et la plantation des plants d'amarante. On nourrit les larves d'un lot avec les feuilles de mûrier provenant de parcelles de monoculture (mûrier infesté) et celles du deuxième lot avec les feuilles des parcelles intercalées (mûrier infesté - amarante). On enregistre le poids des larves et celui des feuilles quotidiennement jusqu'à ce que les larves commencent à filer. On détermine le pourcentage de soie (poids de la coque / poids du cocon  $\times 100$ ). On comptabilise toutes les données pour l'analyse statistique avec le test t de Student.

## **RESULTATS**

Le Tableau I montre l'utilisation de l'amarante comme culture piège de *M. incognita* en interculture avec du mûrier sur un terrain naturellement infesté par *M. incognita* ( $P < 0,01$  d'après l'ANOVA). Les feuilles et les racines provenant des parcelles de mûrier intercalées présentent une teneur plus élevée en protéines. Tandis que la population de *M. incognita* augmente significativement à la fois dans le sol et dans les racines en 105 jours dans les champs de monoculture de plants de mûrier, la population baisse significativement dans le sol et dans les racines des champs de cultures intercalées pendant la même période. Le nombre de galles de la racine de mûrier baisse aussi significativement dans les parcelles intercalées. Mais l'amarante présente l'intensité la plus élevée d'infestation par les nématodes. On prend en considération les mêmes résultats que l'on a obtenus pour les trois répétitions et toutes les données pour l'analyse statistique.

Le Tableau II montre les effets sur l'alimentation des vers à soie ainsi que l'augmentation de la production de soie à des fins commerciales ( $P < 0,05$  d'après le test t). La consommation moyenne de feuilles par le 5<sup>ème</sup> âge est moins importante pour les parcelles intercalées de plants de mûrier que pour les parcelles de monocultures. Par ailleurs, le poids frais moyen du 5<sup>ème</sup> âge ainsi que le poids du cocon et de la coque sont plus élevés avec les plants de mûrier des parcelles intercalées que de celles de monocultures. La richesse soyeuse (poids de la coque / poids du cocon  $\times 100$ ) est aussi plus élevée pour les parcelles intercalées de plants de mûrier que pour celles de monocultures. D'autre part, le taux de mortalité est moins important (2 %) pour les parcelles intercalées de plants de mûrier par comparaison à 30 % pour les monocultures.

## **DISCUSSION**

Non seulement l'interculture de plants d'amarante avec du mûrier diminue les populations de nématodes de la racine (Datta et coll., 2000 ; Datta 2005a, b, 2006b), mais elle améliore aussi la valeur nutritive des feuilles de mûrier. L'augmentation de la valeur nutritive contribue à la croissance et à la survie plus importantes des larves de vers à soie, ce qui augmente significativement la production de soie à des fins commerciales, (Datta et coll., 1997 ; Datta, 2005a, 2006a, b, b, 2007 ; Datta et



Datta, 2006a, b). L'amélioration de la santé des larves provenant du groupe qui se nourrit avec des feuilles de mûrier, cultivées en interculture, donne un taux de mortalité plus bas (2 %). On a déjà observé que l'amarante est très sensible aux nématodes de la racine par comparaison au mûrier (Datta et coll., 2000 ; Sukul et coll., 2001 ; Datta, 2005 a, b, 2006 a, b ; 2007 ; Datta et Datta, 2006a, b). Cela ne signifie pas que les mûriers résistent aux nématodes de la racine. Plutôt que le mûrier est un très bon hôte de ces nématodes. Cependant, les nématodes de la galle de la racine préfèrent se nourrir sur de l'amarante plutôt que sur du mûrier, quand ils ont le choix, et la taille relative des deux systèmes racinaires et la biomasse des racines est ce qui fait réellement la différence de sensibilité entre les deux plantes (Datta, 2005a, b, 2006a, b, 2007 ; Datta et Datta, 2006a, b). On a aussi observé que l'amarante est plus sensible aux nématodes que les autres plantes, viennent ensuite le concombre, la dolique, l'okra et le mûrier dans l'ordre du degré de sensibilité (Datta et coll., 2000 ; Datta, 2005a, b, 2006b, 2007 ; Datta et Datta, 2006a, b). Puisque le système racinaire de l'amarante occupe et colonise une grande surface, il est probable que les nématodes parasites de la plante préfèrent ses racines (Datta et coll., 2000 ; Datta, 2005a, b ; 2006b ; 2007 ; Datta et Datta, 2006, a, b). Il a déjà été confirmé que la plantation d'autres plantes, différentes de l'amarante, n'entraîne pas la diminution de l'infestation du mûrier (Datta et coll., 2000 ; Datta, 2005a, b, 2006b, 2007 ; Datta et Datta, 2006a, b). Pendant l'expérience, on échange le sol entre les plants pour maintenir l'infestation par les nématodes aussi uniforme que possible dans le champ naturellement infesté (Datta et coll., 1997 ; Datta, 2005a, b, 2006a, b, 2007). Il apparaît que les nématodes se distribuent de manière égale entre le sol et le système racinaire.

On pourrait supposer que l'expérience n'a pas été réalisée pendant une période de temps assez longue pour observer l'impact négatif de l'interculture d'amarante avec le mûrier. Parce que l'amarante est aussi un hôte tellement bon pour le nématode, qu'elle finira par entraîner des populations de nématodes extrêmement élevées qui pourraient nuire au mûrier. Pour cette raison, on récolte ou on déracine tous les plants d'amarante au bout de 105 jours.

Une fois de plus, ces résultats suggèrent qu'on pourrait lutter facilement et efficacement contre une maladie par l'utilisation de plants d'amarante, intercalés avec des plants de mûrier dans une muraille infestée naturellement par la galle de la racine, comme « culture piège » des nématodes des galles de la racine. Cette méthode permet une augmentation de la production de soie à des fins commerciales (Datta, 2005a, b, 2006a, b, 2007) et cela serait non seulement un moyen facile, bon marché, non phyto-toxique et non polluant mais il permettrait également de conserver notre biodiversité. Les agriculteurs auraient le double avantage d'acheter et de vendre régulièrement les plants d'amarante comestibles. Il faut la récolter fréquemment pour conserver la population de nématodes à un niveau minimum dans les champs infestés par les nématodes de la galle de la racine.

On peut conclure que l'utilisation de plants d'amarante comestibles intercalés pourrait servir de bonnes « cultures pièges » des nématodes parasites des plantes chez tous les types de cultures de légumes commerciales où la lutte chimique représente un risque sérieux pour la santé de l'homme et de nombreux herbivores, larves, micro et macro faunes du sol à cause de la toxicité résiduelle des feuilles et du sol. Cette méthode enrichirait la sériciculture ainsi que l'économie agricole sans déranger la biosphère.



## EFFECT OF GREEN MANURE ON GROWTH AND YIELD OF MULBERRY UNDER IRRIGATED CONDITION

S. N. NARAYAN GOWDA\*, R.M .SHIVAPRAKASH & N. SIDDALINGASWAMY

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,  
Bangalore – 560062, India.

*A field study was conducted at Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore, in an established M5 mulberry garden during 1999-2001 under irrigated condition to know the effect of green manuring on growth and yield of mulberry. Experiment was laid out in a Randomized Complete Block Design (RCBD) with eight treatments and three replications. Sunhemp (*Crotalaria juncea*) and Horsegram (*Dolichus visflorus*) green manure had been used *in – situ* green manure and *Gliricidia* (*Gliricidia maculata*) as *ex – situ* green manure. Two spacings were maintained i.e. 60 × 60cm and 120 × 60cm spacing. Data on growth, yield and quality of mulberry were recorded for four crops with two green manure intercrops. Pooled data of four crops revealed that growth parameters like number of leaves/plant and number of shoots/plant differed significantly among the treatments. Quality parameters like moisture and nitrogen content in leaf and stem and yield parameters like leaf yield and shoot yield did not differed significantly due to treatment effect. However, leaf yield and shoot yield ranged from 15,827 to 19,843 kg/ha and 24,673 to 30,488 kg/ha. The study reports for the first time in mulberry under irrigated condition that green manure crops like sunhemp and horsegram can be grown as *in – situ* in mulberry fields and *gliricidia* can be applied as *ex – situ* without affecting the mulberry leaf yield and quality. Twenty seven and forty percent of nitrogen can be saved by using *in – situ* and *ex – situ* green manures respectively. By doing so use of chemical fertilizer can be reduced and saved.*

**Keywords:** *Gliricidia*, green manure, horse gram, mulberry, nitrogen, organic manure, sunhemp.

### INTRODUCTION

Though organic farming or natural farming is an age old practice in agriculture systematic study is required in the present situation to maintain soil health and environment. It is a known fact that continuous application of inorganic manures to the soil affects the soil health. But at the same time it is difficult to ignore the inorganic manures which are very essential for high biomass producing crops. Since the availability of bulky organic manures like Farm yard manure, compost, vermicompost, oilcakes etc. is scarce in farming community, application of green manures to the mulberry garden helps the farmer to manage this problem to a great extent. Mulberry, the sole food plant of the silkworm is a deep rooted, high biomass producing, perennial crop. Quality of mulberry leaf plays an important role in silkworm growth and cocoon production besides yield. Quality of leaf mainly depends on the nutrient status of the soil and its availability to the plant. It is evident from the literature that growing leguminous crops as intercrops and incorporation of green biomass increases the availability of nutrients in the soil besides addition of organic matter and nitrogen fixation. Information on green manuring in mulberry is very limited. Keeping in view this situation, the present

\* Author for correspondence.

study was started in order to know the effect of green manuring on growth and yield of the mulberry under irrigated condition.

## MATERIALS AND METHODS

A field study was conducted at Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore, in an established M5 mulberry garden during 1999-2001 under irrigated condition. sunhemp and horsegram has been used as *in-situ* green manure and Glyricidia as *ex-situ* green manure. Spacing of mulberry was 60 x 60cm and 120 x 60cm. After bottom pruning of mulberry garden, weeds and old mulberry leaves were removed, dugged and the soil leveled. Seeds of sunhemp and horsegram were sown in between mulberry rows in the second week after pruning. Recommended dose of chemical fertilizers ( Jolly,1987) was applied to all the experimental plots in the fourth week. Irrigation was given once in a week during non – rainy periods. After the harvest of mulberry field, green biomass of sunhemp and horsegram was harvested and incorporated into the respective plots. Succulent shoots with leaves of Glyricidia plant were collected from outside and incorporated into the respective plots. Quantity of Glyricidia leaf required to equate recommended dose of chemical fertilizer had been calculated based on the nitrogen content in Glyricidia leaf on dry weight basis. The same method was followed for sunhemp and horsegram green manure also and amount of nitrogen to be given was balanced through chemical fertilizer in the second crop. Recommended dose of chemical fertilizer had been given to control plots.

The experiment was laid out in a Randomized Complete Block Design (RCBD) with eight treatments and three replications. The treatment combinations were as follow :

- T1: 60 × 60cm - Control
- T2 : 60 × 60cm - Glyricidia
- T3 : 60 × 60cm - Sunhemp
- T4 : 60 × 60cm - Horsegram
- T5 : 120 × 60cm - Control
- T6 : 120 × 60cm - Glyricidia
- T7 : 120 × 60cm - Sunhemp
- T8 : 120 × 60cm - Horsegram

Observations on mulberry growth, leaf yield, moisture and nitrogen content in leaf were recorded at 70-75 days after pruning adopting shoot harvest method for all the four crops. Nitrogen content in leaf and stem was estimated following Jackson method (1973). After bottom pruning of first crop of mulberry, green manure crop which was at the stage of flowering was harvested and recorded the yield. Green biomass was incorporated into the soil by making small trenches between mulberry rows. Sowing was not done for the second crop. After the second crop the above described packages of practices was repeated.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

Growth parameters like number of leaves/plant, number of shoots/plant showed significant difference among the treatments (Table I). Number of leaves/plant and number of shoots/plant was significantly less in closer spacing i.e. 60 × 60cm compared to wider spacing i.e. 120 × 60cm. Duncan's multiple range test indicates highly significant differences for T6 to T8 compared to T1 to T4. In respect of number of leaves/plant the treatment T5 is also found highly significant in comparison with T4 and significant in comparison with T3. Others are not found significant at 5% and 1% levels. It was observed that T7 gave maximum number of leaves/plant (127.58). Based on the same test criterion the treatments T5 –T8 were found to be highly significantly different from T1 –T4 in respect of No. of shoots/plant. The maximum number of shoots/plant was observed in T8 (9.1)

(Table II). This is because of number of plants per unit area was less in wider spacing. This enables the plant growth and increases the number of shoots and leaves/plant. This observation is in accordance with Das *et al.*, (1993) who opined that the height of the plant, number of shoots and number of leaves/plant increased significantly by wider spacing. Leaf and stem moisture and nitrogen content did not differ significantly. However, nitrogen content in mulberry leaf and stem was ranged from 2.27 to 2.70% and 1.10 to 1.26% respectively (Table III). Pooled data of 4 crops with two intercrops revealed that mulberry yield parameters like leaf yield and shoot yield did not differ significantly due to the treatment effect (Table IV). Shoot yield and leaf yield were on par with each other in all the treatments and in both the spacings studied. Total leaf yield ranged from 19,050 to 19,843 kg/ha in closer spacing and 15,827 to 17,823 kg/ha in wider spacing. It is an interesting observation. Though the number of leaves/plant and the number of shoots/plant are significantly higher in the treatments T5-T8 (Wider spacing) compared to T1-T4 (Closer spacing) the total leaf yield component has shown a different trend altogether. The leaf yield is found to be higher in closer spacing compared to wider spacing. This maximum yield in closer spacing is because of more number of plants per unit area. This is supported by the reports of Kasivishwanathan *et al.*, (1977) and (1979), Tikader *et al.* (1993) and Ghosh *et al.* (1997) that were reported increased leaf yield with decrease in spacing.

Sinha *et al.*, (2000) reported that green manuring with sunhemp can be a better and suitable substitute for increased mulberry leaf production under rainfed condition. Das *et al.*, (1999) opined that for advantageous soil moisture conservation under dry farming conditions and in order to maximise the mulberry leaf yield leguminous green manuring crop should be grown between the rows of mulberry and the same can be incorporated into the soil before flowering

**Table I. Effect of green manure on the growth of mulberry.**

**Tableau I. Effet des engrais verts sur la croissance du mûrier.**

Treatments	No. of leaves/plant	No. of shoots/plant	Shoot height (cm)
Traitements	Nbre de feuilles / plant	Nbre de pousses / plant	Hauteur de la pousse (cm)
T1	95.25	6.96	68.92
T2	95.25	7.10	73.42
T3	95.67	6.62	81.50
T4	87.92	6.87	71.25
T5	112.08	8.57	71.17
T6	122.25	8.96	74.08
T7	127.58	8.62	81.50
T8	123.42	9.10	76.75
F – test	HS	HS	NS
CD @ 5%	16.43	0.86	-
SD	20.12	1.05	11.65



Table II. Duncan's multiple range test for No. of leaves/plant and No. of shoots/plant.

*Tableau II. Test de rang de Duncan pour le nombre de feuilles / plant et le nombre de pousses / plant.*

No. of leaves / plant / *Nbre de feuilles / plant.*

Treatment	Mean value	Duncan's range values		
		No. of means	5%	1%
Traitement	Valeur moyenne	Fourchette des valeurs de Duncan		
		Nbre de moyennes	5 %	1 %
T4	87.92	D8	19.04	24.79
T1	95.25	D7	18.80	24.55
T2	95.25	D6	18.50	24.21
T3	95.67	D5	18.22	23.92
T5	112.06*	D4	17.87	23.39
T6	122.25**	D3	17.28	22.75
T8	123.42**	D2	16.42	21.83
T7	127.58**			

No. of shoots/plant / *Nbre de pousses / plant.*

Treatment	Mean value	Duncan's range values		
		No. of means	5%	1%
Traitement	Valeur moyenne	Fourchette des valeurs de Duncan		
		Nbre de moyennes	5 %	1 %
T3	6.17	D8	0.99	1.30
T4	6.87	D7	0.98	1.28
T1	6.96	D6	0.97	1.26
T2	7.10	D5	0.95	1.25
T5	8.57**	D4	0.93	1.22
T7	8.61**	D3	0.90	1.19
T6	8.96**	D2	0.85	1.14
T8	9.10**			

\*\* Significantly higher compared to T1 to T4 / *Significativement plus élevé par comparaison de T1 à T4.*

**Table III. Effect of green manures on nitrogen and moisture content of mulberry crop.***Tableau III. Effet des engrais verts sur la teneur en azote et en humidité de la culture de mûrier.*

Treatments	Leaf nitrogen	Stem nitrogen	Leaf moisture	Stem moisture
<i>Traitements</i>	<i>Azote de la feuille (%)</i>	<i>Azote de la tige (%)</i>	<i>Humidité de la feuille (%)</i>	<i>Humidité de la tige (%)</i>
T1	2.70	1.24	69.75	70.84
T2	2.55	1.21	69.75	70.60
T3	2.60	1.14	71.47	71.14
T4	2.58	1.11	69.43	69.64
T5	2.27	1.16	69.32	65.70
T6	2.63	1.10	69.94	70.68
T7	2.70	1.26	69.65	72.68
T8	2.55	1.23	69.93	70.05
F - test	NS	NS	NS	NS
CD @ 5%	-	-	-	-
SD	0.45	0.21	1.66	6.77

**Table IV. Effect of green manure on yield of mulberry.***Tableau IV. Effet de l'engrais vert sur le rendement du mûrier.*

Treatments	Leaf yield/ha (kg) (pooled 4 harvests)	Shoot yield/ha (kg) (pooled 4 harvests)
<i>Traitements</i>	<i>Rendement en feuilles / ha (Regroupement de quatre récoltes) (kg)</i>	<i>Rendement en pousses / ha (Regroupement de quatre récoltes) (kg)</i>
T1	19050.33	28495.00
T2	19393.33	29987.00
T3	19252.67	29807.67
T4	19843.67	30488.67
T5	17823.00	27980.67
T6	15827.67	24673.00
T7	17691.00	28507.33
T8	15997.00	24861.33
F - test	NS	NS
CD @ 5%	-	-
SD	1865.34	3107.57

In the present study it could be concluded that green manure crop like sunhemp and horsegram, can be grown as *in-situ* in mulberry fields and Glyricidia can be applied as *ex-situ* without affecting the leaf yield and quality. Twenty seven and forty percent of nitrogen can be saved by using *in-situ* and *ex-situ* green manuring respectively. By doing so use of chemical fertilizer can be reduced and saved.

### ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the authorities of the Institute for the facilities and statistical officer for the statistical analysis.

### REFERENCES

- DAS P.K., CHOUDHURY P.C., GUPTA Y.K., GHOSH D. & DATTA R. K. (1993) Effect of different levels of nitrogen, phosphorus and spacing on the growth, yield and nutritional quality of mulberry under rainfed conditions. *Indian J. Seric.* 32(2) : 201- 207.
- DAS P.K., CHOUDHURY P.C., Ghosh A., MALLIKARJUNA B., SURYANARAYANA N. & SENGUPTA K. (1999) Effect of green manuring, dry weed and black polythene mulching on soil moisture conservation, growth and yield of mulberry and their under rainfed condition. *Indian J. Seric.* 29 (2) : 263-272.
- GHOSH A., AMBIKA P. K. & MISHRA R.K.(1997) Effect of varieties, spacings and fertilizer doses on growth, yield and quality of mulberry. *Indian J. Seric.* 36 (2) : 138-141.
- JACKSON M. L. (1973) Soil chemical analysis. Prentice Hall of India Pvt.Ltd., New Delhi , India. p.338.
- JOLLY M. S. (1987) Appropriate Sericulture Techniques, CSR&TI, Mysore , India.p,172.
- KASIVISHWANATHAN K., KRISHNASWAMI S & VENKATARAMAN C.V. (1977) Studies on varietal cum spacing and nitrogen fertilization on the leaf yield of mulberry under irrigated condition in Karnataka State, India. *Indian J.Seri* 14: 10-18.
- KASIVISHWANATHAN K., KRISHNASWAMI S & CHOUDHURY P.C. (1979) Long term studies on the variety, spacing and nitrogen fertilization for the improvement of yield potential of mulberry. *Indian J. Seri* 18: 23-29.
- SINHA K.K., SINHADEO S.N., CHAKRABORTHY N., DAS B. D., RAO K. V. S. N., DAS D. P., MOHAPOTRA & BRAHMA K.C.(2000) Sunhemp – a green manure for mulberry. *Indian Silk*, 38(11): 12-14.
- TIKADER A., ROYCHOUDHURI S., MISHRA A. K. & DAS C. (1993) Foliage yield of different varieties of mulberry (*Morus* spp) grown at 2 spacings in hills of West Bengal. *Indian J. Agric. Sci.* 63(1) : 36-37.



## EFFET DES ENGRAIS VERTS SUR LA CROISSANCE ET LE RENDEMENT DU MÛRIER DANS DES CONDITIONS D'IRRIGATION

S. N. NARAYAN GOWDA\* , R. M. SHIVAPRAKASH & N. SIDDALINGASWAMY

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

*Nous avons réalisé une étude sur le terrain au Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, de Thalaghattapura à Bangalore dans une muraille de M5 établie en 1999-2001, dans des conditions d'irrigation, pour connaître l'effet des engrais verts sur la croissance et le rendement du mûrier. L'expérience est conçue selon une conception en Blocs Aléatoires (RCBD), avec huit traitements et trois répétitions. On utilise le chanvre (*Crotalaria juncea*) et le haricot (*Dolichus viliflorus*) comme engrais vert *in situ* et *Gliricidia* (*Gliricidia maculata*) comme engrais vert *ex situ*. On maintient deux espacements, c'est-à-dire 60 × 60 cm et 120 × 60 cm. On enregistre les données sur la croissance, le rendement et la qualité du mûrier pour quatre récoltes avec deux intercultures d'engrais verts. Les données regroupées pour quatre récoltes révèlent que les paramètres de croissance, comme le nombre de feuilles / plant et le nombre de pousses / plant diffèrent significativement entre les traitements. Les paramètres de qualité comme l'humidité et la teneur en azote de la feuille et de la tige et les paramètres de rendement comme le rendement foliaire et le rendement en pousses ne diffèrent pas significativement sous l'effet du traitement. Cependant, le rendement foliaire et le rendement en pousses sont compris entre 15 827 et 19 843 kg / ha et entre 24 763 et 30 488 kg / ha. L'étude rapporte pour la première fois que, chez le mûrier irrigué, on peut cultiver des engrais vert comme le chanvre et le haricot *in situ* dans les murailles et qu'on peut appliquer *Gliricidia ex situ* sans affecter le rendement et la qualité des feuilles de mûrier. On peut économiser vingt sept et quarante pourcent d'azote en utilisant respectivement des engrais verts *in situ* et *ex situ*.*

### INTRODUCTION

Bien que l'agriculture biologique ou naturelle soit une pratique séculaire, à l'heure actuelle, il faut des études systématiques pour maintenir la santé du sol et l'environnement. On sait que l'application continue d'engrais inorganiques dans le sol affecte la santé du sol. Mais, parallèlement, il est difficile d'ignorer les engrais non-biologiques qui sont indispensables pour des cultures à biomasse élevée. Puisque les engrais biologiques encombrants, comme le fumier de ferme, le compost, le vermicompost, les tourteaux d'huile sont peu souvent disponibles dans la communauté agricole, l'application d'engrais verts dans les murailles permettrait aux fermiers de gérer ce problème, dans une grande mesure. Le mûrier, la seule plante hôte du ver à soie est une culture pérenne à racines profondes et à biomasse élevée. La qualité de la feuille de mûrier dépend de l'état des nutriments dans le sol et de leur disponibilité pour la plante. D'après la littérature, il est évident que le recours à l'interculture de légumineuses et l'incorporation de biomasse verte augmente la disponibilité des nutriments dans le sol, tout en ajoutant de la matière organique et en fixant l'azote. L'information sur

\* Auteur auquel adresser la correspondance

les engrais verts chez le mûrier est très limitée. Compte tenu de cette situation, nous avons réalisé cette étude pour connaître l'effet des engrais verts sur la croissance et sur le rendement du mûrier irrigué.

## MATERIELS ET METHODES

Nous avons réalisé une étude sur le terrain au *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute*, de Thalaghattapura, à Bangalore, dans une muraille de M5 en 1999 – 2001 dans des conditions d'irrigation. On utilise le chanvre et le haricot comme engrais vert *in situ*. L'espacement des mûriers est de 60 × 60 cm et de 120 × 60 cm. Après la taille basale du mûrier, on retire et on bêche les mauvaises herbes et les vieilles feuilles de mûrier et on nivelle le sol. On sème les graines de chanvre et de haricot entre les rangées de mûrier, pendant la deuxième semaine après la taille. On applique la dose recommandée d'engrais chimiques (Jolly, 1987) dans toutes les parcelles expérimentales pendant la quatrième semaine. On procède à une irrigation une fois par semaine pendant les périodes sans pluies. Après la récolte des mûriers, on récolte la biomasse verte de chanvre et de haricot et on les incorpore dans les parcelles respectives. On recueille les pousses succulentes avec leurs feuilles des plants de *Glyricidia* et on les incorpore dans les parcelles respectives. On calcule la quantité de feuilles de *Glyricidia* nécessaires pour égaler la dose recommandée d'engrais chimique, d'après la teneur en azote de la feuille de *Glyricidia* sur la base du poids sec. On suit aussi la même méthode pour les engrais verts de chanvre et de haricot et on équilibre la quantité d'azote à apporter par les engrais chimiques pendant la seconde récolte. On apporte la dose d'engrais recommandée aux parcelles témoins.

On conçoit l'expérience selon une Conception en Blocs Complètement Aléatoire (RCBD) avec huit traitements et trois répétitions. Les combinaisons de traitement sont les suivantes :

- T1 : 60 × 60 cm – Témoin
- T2 : 60 × 60 cm – *Glyricidia*
- T3 – 60 × 60 cm – Chanvre
- T4 – 60 × 60 cm – Haricot
- T5 – 120 × 60 cm – Témoin
- T6 – 120 × 60 cm – *Glyricidia*
- T7 – 120 × 60 cm – Chanvre
- T8 : 120 × 60 cm – Haricot

On enregistre les observations sur la croissance du mûrier, le rendement foliaire, l'humidité et la teneur en azote de la feuille 70 à 75 jours après la taille, en adoptant la méthode de récolte des pousses pour les quatre récoltes. On estime la teneur en azote de la feuille et de la tige en suivant la méthode de Jackson (1973). Après la taille basale de la première récolte de mûrier, on récolte les engrais verts sur le point de fleurir et on enregistre le rendement. On incorpore la biomasse verte dans le sol en faisant de petites tranchées entre les rangées de mûrier. On ne fait pas de semailles pour la seconde récolte. Après la deuxième récolte, on répète l'ensemble des pratiques décrites ci-dessus.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les paramètres de croissance comme le nombre de feuilles / plant, le nombre de pousses / plant montrent une différence significative entre les traitements (Tableau I). Le nombre de feuilles / plant et le nombre de pousses / plant est significativement moins important avec l'espacement le plus étroit, c'est-à-dire 60 cm × 60 cm, par comparaison à l'espacement plus large de 120 × 60 cm. Le test multiple de Duncan indique des différences très significatives de T6 à T8 par comparaison à T1 - T4. On constate aussi que le traitement T5 est très significatif pour le nombre de feuilles / plant par rapport

au traitement T4 et significatif en comparaison avec T3. On ne trouve pas les autres traitements significatifs aux seuils de 5 % et de 1 %. On observe que T7 donne le nombre maximum de feuilles / plant (127,58). D'après les mêmes critères de test, les traitements T5 à T8 s'avèrent être très significativement différents de T1 à T4, pour le nombre de pousses / plant. On observe le nombre maximum de pousses / plant chez T8 (9,1) (Tableau II). Cela se produit parce que le nombre de plants par unité de surface est moins important avec un espacement plus large. Cela permet la croissance de la plante et augmente le nombre de pousses et de feuilles / plant. Cette observation est en accord avec celle de Das et coll., (1993) qui ont émis l'opinion que la hauteur du plant, le nombre de pousses et le nombre de feuilles / plant augmentent significativement avec un espacement plus large. L'humidité de la feuille et de la tige et la teneur en azote ne diffèrent pas de manière significative. Cependant, la teneur en azote de la feuille et de la tige de mûrier est comprise entre respectivement 2,27 à 2,70 % et 1,10 à 1,26 % (Tableau III). Les données regroupées pour 4 récoltes avec deux intercultures révèlent que les paramètres de rendement du mûrier comme le rendement en feuilles et le rendement en pousses ne diffèrent pas significativement sous l'effet du traitement (Tableau IV). Le rendement en pousses et le rendement en feuilles sont égaux chez tous les traitements et avec les deux espacements étudiés. Le rendement foliaire total est compris entre 19 050 et 19 843 kg / ha avec l'espacement le plus étroit et 15 827 et 17 823 kg / ha avec l'espacement le plus large. Ceci est une observation intéressante. Bien que le nombre de feuilles / plant et le nombre de pousses / plant soient significativement plus élevés avec les traitements T5 à T8 (espacement le plus large) par comparaison à T1 – T4 (espacement le plus étroit) la composante de rendement foliaire total présente une tendance tout à fait différente. On constate que le rendement foliaire est plus élevé avec l'espacement plus étroit par comparaison à l'espacement plus large. On obtient ce rendement maximum avec l'espacement plus étroit parce qu'il y a un nombre plus important de plants par surface unitaire. Les rapports de Kasivishwanathan et coll., (1977) et (1979), Tikader et coll., (1993) et Ghosh et coll., (1997) qui ont rapporté une augmentation du rendement foliaire avec la diminution de l'espacement, confirment cela.

Sinha et coll., (2000) ont rapporté que les engrais verts comme le chanvre peuvent être une alternative meilleure et convenable, pour l'augmentation de la production de feuilles de mûrier dans des conditions sans irrigation. Das et coll., (1999) ont émis l'opinion que pour conserver avantageusement l'humidité du sol, dans des conditions d'agriculture sèche et pour maximiser le rendement en feuilles de mûrier, il faudrait cultiver des engrais verts de légumineuses entre les rangées de mûrier et il faudrait les incorporer dans le sol avant la floraison.

D'après cette étude, on peut conclure qu'il est possible de cultiver des engrais vert comme le chanvre et le haricot *in situ* dans les muraies et d'appliquer *Glyricidia ex situ* sans effet sur le rendement foliaire et la qualité de la feuille. On peut économiser respectivement vingt sept et quarante pourcent d'azote en utilisant respectivement l'engrais vert *in situ* et *ex situ*. De cette manière, on peut ainsi diminuer et économiser l'utilisation d'engrais chimique.



**BIOCHEMICAL BASIS OF ROOT INDUCTION IN SHOOT CUTTINGS OF *TERMINALIA ARJUNA* (BEDD.), A PRIMARY FOOD PLANT OF TROPICAL TASAR SILKWORM *ANTHRAEA MYLITTA* D- ROLE OF PHENOL IN ROOT FORMATION**

**P. S. SINHA, SHOVA BECK, RAM KUMAR, S. N. SINHADEO, V. N. BARDAIYAR & N. SURYANARYANA**

Central Tasar Research and Training Institute, P.O. Piska Nagri, Ranchi, Jharkhand, India Pin- 835303

*Terminalia arjuna* is the primary food plant of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. It falls in the category of "Most difficult to root" plant species. Earlier experiments carried out to regenerate it through cuttings at Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi, India, for about last forty years could not yield much. Recently scientists of the above mentioned institute were able to develop a protocol, in order to regenerate the above plant. However its simple regeneration by utilizing cuttings from mature trees is still not feasible. Reduced phenol contents may be the probable factor responsible for reduced rooting potential in grown up plants. Phenolic compounds are known to induce juvenility and are also known to act synergistically with indole-butyric acid in stimulating root induction. It is also reported that role of phenolic compounds in root promotion could act least partially, in protecting root inducing naturally occurring auxins from destruction by the enzyme indole acetic acid oxidase. The present study was made to investigate the phenol contents of different types of shoot cuttings from different sources, vis-à-vis, their rootability and also to study the effect of exogenous application of phenol on the rootability of stem cuttings to establish relation between rootability and phenol contents for exploiting the same in order to develop proper techniques of propagating *T. arjuna* through mature tree cuttings. The findings suggest a) Phenol content has a direct and positive correlation with rootability in *Terminalia arjuna*. b) Phenol content of an accession/genotype can be an indicator of rooting potential and hence can be treated as biochemical marker of its rootability. c) Modulation of the phenol contents may serve as a useful tool in inducing rooting. d) Girdling can be very well used to produce material with higher rootability through juvenility induction. This may serve as a handy substitute to drastic pruning requirement for juvenility induction in difficult rooters. The findings may serve as basis for formulating a technology for true to the type quicker and easy multiplication.

**Keywords:** Rooting, Phenol contents, Cuttings, Girdles, Accession, Type of branches.

## INTRODUCTION

Rooting is a complex phenomenon and is controlled by a number of factors like genetic, anatomical, physiological, and biochemical or a combination of two or more factors (Sinha *et al.*, 2003). Many internal factors like age of the stock plant, nutritional and hormonal conditions of the plant, maturity of the tissues, light, temperature, water etc. are reported to influence rooting (Bose *et al.*, 1975). Depending upon the rootability of cuttings, the plant species are categorized as easy rooters and hard rooters etc. *Terminalia arjuna*, a primary food plant of tropical tasar silkworm, *Antheraea*

*mylitta* falls in the category of "Most difficult to root plant species" (Sinha *et al.*, 2003). Earlier experiments, carried out at Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi, India, constantly for last forty years to regenerate it through cuttings could not yield any substantial results (Sinha *et al.*, 2001). Recently, scientists of this institute were able to identify the reasons of failure of rooting and were able to regenerate *T. arjuna* to the tune of 86.6% by countering the hindrance (Sinha *et al.*, 2001), and were able to develop a protocol for its regeneration (Sinha *et al.*, 2003); however, its simple regeneration by utilizing cuttings from mature trees is still difficult.

Reduced rooting potential as the plants grow old may be due to lowering of phenolic levels (Hartmann and Kester, 1976). In certain plants lower phenolic levels were noticed in mature form compared to juvenile form (Girouard, 1969). Phloroglucinol 1,3,5 tri hydroxybenzene, a phenolic compound is known to induce juvenility and is also known to act synergistically with indole-butyric acid in stimulating root induction in root stocks and shoot cuttings (James and Thurban, 1981). It is known to stimulate rooting in *Rubus* (James, 1979 and James *et al.*, 1980) and in *Prunus* (Jones and Hopgood, 1979). Hess (1962) found that the phenolic compound catechol reacts synergistically with indole acetic acid in root production in Mung bean bioassay. Donoho, *et al.*, (1962), however, were of the opinion that action of phenolic compounds in root promotion could act at least partially in protecting the root inducing naturally occurring auxins from destruction by the enzyme indole acetic acid oxidase. In mango, Sadhu and Bose (1982) identified three phenolic acids i.e. ferulic acid, p-hydroxybenzoic acid and p-coumaric acid in the stem tissue extracts and each of these phenolic acids greatly synergized auxin induced root formation (Sadhu *et al.*, 1978). These findings clearly suggest the role of phenols in the root induction in shoot cuttings. In this backdrop, the present study was chalked out to investigate the phenol contents of different types of shoot cuttings from different sources vis-à-vis their rootability and also to study the effect of exogenous application of phenol on the rootability of stem cuttings to establish a relation between rootability and phenol for exploiting the same for getting higher rooting for large scale multiplication of superior genotypes and also to bring down the long gestation period of *T. arjuna* plantation for tasar silkworm rearing.

## MATERIALS AND METHODS

The study involved the determination of phenol contents and rootability of *T. arjuna* leaf node cuttings derived from following groups

- Different types of plantation i.e. bush, middling and tree.
- Different types of branches, i.e. primary secondary or tertiary with and without girdling. The branches sprouted both below and above the girdles were used.
- Different points of the same branch.
- Different accessions.

Phenol contents were determined by Bray and Thorp (1954) method.

For rootability study 60 cuttings, @ 20 cuttings/replicate, were planted in polybags of 30 × 10 cm filled with sterile sand. The polybags were kept in subsoil pits of 2m × 1m × 1m and covered with transparent polyethylene sheets. The cuttings and the walls of pits were sprayed with water two to three times a day to maintain humidity level around 80%. Regular observations were made on root induction.

Besides this, the efficacy of exogenous application of one phenol, i.e. coumarin in inducing rootability was also studied. Trees of more than 25 years of age were pruned at 180 cm height and the sprouts were sprayed with four different concentrations of aqueous solution of coumarin thrice at three days interval. The control sets were sprayed with plain water. The developed branches were used as cuttings for propagation and their rootability was studied as per method described above.

## RESULTS AND DISCUSSION

Data on phenol contents and rootability are tabulated in table I, II and III and fig 1. Data pertaining to effect exogenous application of phenol on rooting are presented in table IV.

**i) Variation in phenol contents and rootability with age and the form of mother plant:**

Table I indicates that phenol contents were higher in seedlings, followed by sapling < bushes < trees maintained at 180 cm height and least in grown up trees. The three months old seedlings exhibited 378.3% more phenol contents than grown up trees. Phenol contents declined with increase in age of plant and also with maturity. Plants maintained in bush form had higher phenol contents than those maintained as middling and tree indicating that the rootability varied in almost same order. It was maximum in seedlings and minimum in grown up trees. It is also found that more than 1 unit (mg / g fresh weight) of phenol content is quite conducive to root initiation, phenol contents between 0.5 to 0.6 units could just initiate rooting while below 0.5 units, it does not induce rooting. Rooting time was found to be more for bush/tree material compared to that of seedlings and saplings.

**Table. I. Variation in phenol contents and rootability of cuttings in relation to age and form of mother plants.**

*Tableau I. Variation des teneurs en phénol et de la capacité de racinement des boutures en fonction de l'âge et de la forme des plants mères.*

Age / form of mother plant	Phenol contents (mg/g fresh weight)	Rooting (%)	Rooting time (days)
<i>Age / forme du plant mère</i>	<i>Teneur en phénol (mg / g de poids frais)</i>	<i>Racinement (%)</i>	<i>Délai de racinement (jours)</i>
Three months old seedling <i>Plantules de trois mois</i>	1.416 ± 0.01	78.33 ± 7.5	32.66 ± 0.58
Three months old saplings <i>Jeunes plants de trois mois</i>	1.363 ± 0.03	71.66 ± 5.8	34.33 ± 1.15
Fifteen years old plants maintained in bush form <i>Plants de 15 ans maintenus sous forme de buissons</i>	1.188 ± 0.02	66.6 ± 2.8	36.66 ± 1.15
Fifteen years old plants maintained as middling at 180 cm <i>Plants de 15 ans maintenus à une taille moyenne de 180 cm</i>	0.571 ± 0.02	6.66 ± 2.8	37.00 ± 1.75
Fifteen years old plants maintained as trees <i>Plants de 15 ans maintenus sous forme d'arbres</i>	0.296 ± 0.02	0.0 ± 0	0.0 ± 0
CD at 5% / <i>CD à 5 %</i>	0.041	8.46	1.99
HSD value at 5% / <i>Valeur HSD à 5 %</i>	0.060	12.49	2.94



**Table II. Variation in phenol contents and rootability in stem cuttings in relation to type and position of girdled branches.**

*Tableau II. Variation des teneurs en phénol et de la capacité de racinement des boutures de tige par rapport au type et à la position des branches incisées.*

Source	Position in relation to girdle / <i>Position par rapport à l'incision</i>											
	Without girdle <i>Sans incision</i>			Below the girdle <i>En dessous de l'incision</i>			Above the girdle <i>Au-dessus de l'incision</i>			Average <i>Moyenne</i>		
	Phe	RP	RT	Phe	RP	RT	Phe	RP	RT	Phe	RP	RT
Primary <i>Primaire</i>	0.403	3.8	32.5	1.391	41.2	33.8	0.565	3.75	33.6	0.79	16.3	33.3
Secondary <i>Secondaire</i>	0.381	0.0	NA	0.959	27.5	34.8	0.609	3.75	34.5	0.65	10.4	34.8
Tertiary <i>Tertiaire</i>	0.338	0.0	NA	0.709	25.0	35.5	0.550	2.5	36.0	0.53	9.2	35.8
Average <i>Moyenne</i>	0.374	1.3	32.5	1.019	31.3	34.7	0.574	3.3	34.7			
CD at 5% <i>CD à 5 %</i>	For phenol cont. <i>Pour la teneur en phénol</i>			For rooting percent <i>Pour le % de racinement</i>			For rooting time <i>Pour la durée du racinement</i>					
Type of branch <i>Type de branche</i>	0.018			3.12			10.71					
Position	0.018			3.12			10.71					
Type × Position	0.032			5.41			21.42					

**Phe** = Phenol contents (mg/g fresh weight) / *Teneur en phénol (mg / g de poids frais).*

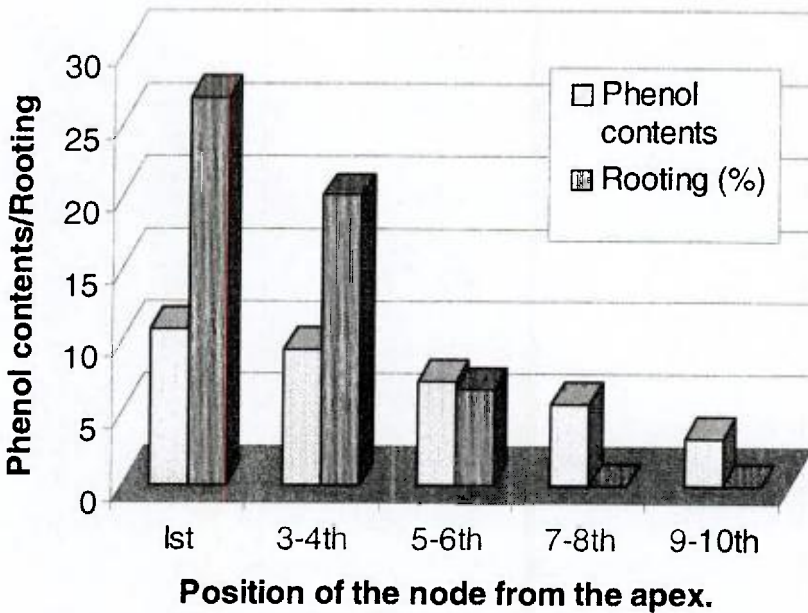
**RP** = Rooting percent / *Pourcentage de racinement.*

**RT** = Rooting time (days) / *Durée du racinement (jours).*

**ii) Variation in phenol contents with type of branch and girdling:**

Table II represents variation in phenol contents with type of branch and its position in relation to girdle. Phenol contents were higher in primary branches followed by secondary and tertiary. Primary branches were found to have 47.7% more phenol than tertiary branches. Girdling could improve the phenol status of the branch. The girdled branches invariably showed much higher phenol contents than un-girdled branches. Further the phenol contents below and above the girdle were also not same and were higher below the girdles. The phenol contents were in order of below the girdle > above the girdle > un-girdled. Primary branches below the girdle were found to have maximum phenol and even secondary and tertiary branches below the girdles had higher phenol. Here also rootability has followed almost the same trend as exhibited by phenols, indicating that phenol contents have association with rooting. Higher the phenol contents more the rooting and phenol contents appears to have a threshold level as below 0.4 units no rooting was observed, at 0.4 to 0.6 units nominal rooting (Approx 4 %) was observed and above 0.7 units rooting has been to the tune of 25% or more which has further reached to a level 41.25% with increasing phenol contents up to 1.391 units.

The branches originating below the girdles were invariably having higher phenol contents than the above the girdle portion.



**Fig. 1. Variation of phenol contents (mg / g fw. × 10) and rooting (%) from apical to basal nodes of *T. arjuna* primary branch.**

Position of the node from the apex / Position du nœud par rapport au sommet.

**Fig 1. Variation de la teneur en phénol (mg / g pf. × 10) et du racinement (%) des nœuds apicaux aux nœuds basaux dans les branches primaires de *T. arjuna*.**

**iii) Variation in phenol contents from apical to basal portion of the branch:**

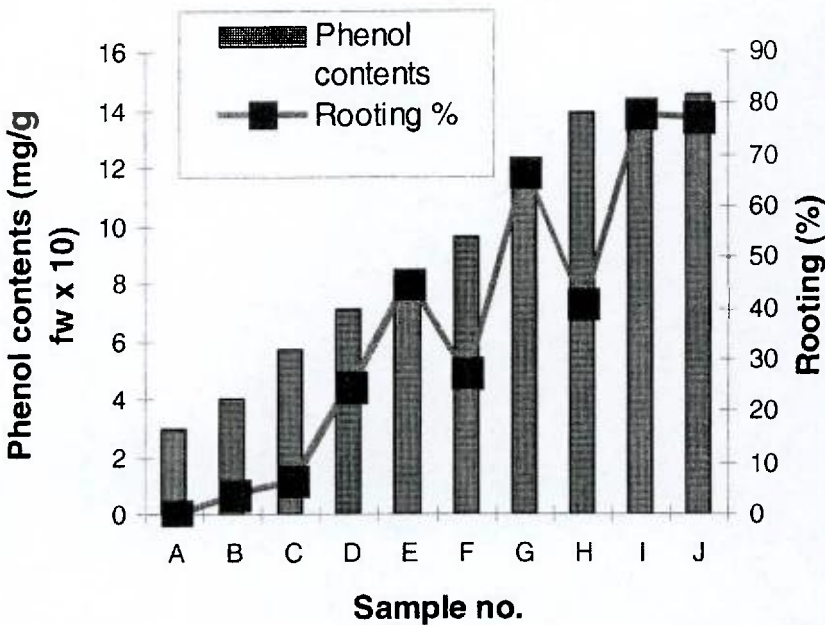
Fig. 1 shows the variation in phenol contents in the same branch from apical to 10<sup>th</sup> node. There is a gradual decline in phenol contents from apical to basal portion e.g. 9-10<sup>th</sup> node has 228.8% lesser phenol than the apical one. Here too the apical portion exhibited higher rooting and it declined from apical to basal portion again suggesting the relation between the two.

**iv) Variation of phenol contents in different accessions:**

Table III suggests the variation of phenol contents in 13 different accessions vis a vis their rootability. Phenol contents of accessions varied from 0.281 to 1.450. The rootability varied from 0 to 77.5%. The accessions having higher phenol contents invariably showed higher rooting again suggesting the relationship between the two.

**Correlation between phenol contents and rooting:**

Fig 2 presents the correlation between phenol contents and rooting. The rooting improved with increase in the phenol contents suggesting a direct and positive correlation. However, the relation is not linear. The non linear relation may due to the fact that phenolic composition of all treatments may not be the same and different phenols do not have the same effect.



**Fig. 2. Correlation between phenol contents and rooting.**

Phenol contents : *Teneur en phénol*. Sample no. / *No de l'échantillon*.

Rooting % : *% de racinement*.

**Fig 2. Corrélation entre la teneur en phénol et le racinement.**



**Table III. Variation in phenol contents and rootability in different accessions tested.***Tableau III. Variation de la teneur en phénol et de la capacité de racinement chez différentes variétés testées.*

Accession no.	Phenol contents	Rooting (%)	Rooting time (days)
<i>No. d'exemplaire</i>	<i>Teneur en phénol</i>	<i>Racinement (%)</i>	<i>Délai de racinement (jours)</i>
G1	1.400 ± 0.025	72.5 ± 7.5	33.0 ± 1.0
G2	1.450 ± 0.025	77.5 ± 2.5	34.0 ± 1.0
G3	1.238 ± 0.013	70.0 ± 5.0	33.5 ± 0.5
G4	1.213 ± 0.013	52.5 ± 2.5	34.5 ± 0.5
G5	0.319 ± 0.019	00.0 ± 0.0	00.0 ± 0.0
G6	0.281 ± 0.006	00.0 ± 0.0	00.0 ± 0.0
G7	0.388 ± 0.025	00.0 ± 0.0	00.0 ± 0.0
G8	0.569 ± 0.019	12.5 ± 2.5	33.5 ± 0.5
G9	0.819 ± 0.032	45.0 ± 0.0	35.0 ± 1.0
G10	0.506 ± 0.019	10.0 ± 0.0	34.5 ± 1.5
G11	0.588 ± 0.013	12.5 ± 2.5	33.0 ± 0.0
G12	0.569 ± 0.032	15.0 ± 0.0	33.5 ± 0.5
G13	0.525 ± 0.013	10. ± 0.0	34.5 ± 0.5
CD at 5% / CD à 5 %	0.044	14.28	2.16
HSD	0.078	15.2	3.76

**The influence of exogenous application of phenol on rooting:**

The influence of exogenous application of phenol on rooting is presented in Table IV. It is indicating that spraying of coumarin solution on sprouts produced by pruning has induced rootability in the branches developed from these sprouts. The degree of rootability increased with increase in concentration of coumarin up to 3000 ppm and subsequent increase in concentration of coumarin declined the rooting.

The foregoing results clearly suggest that phenol contents have a definite role in root induction. Hartmann and Kester (1976) have ascribed the reduced rooting potential of the plants to reduction in phenol contents. The phenolic compounds improves rooting either by acting synergetically with

IAA (Hess,1962) or through protection of root inducing naturally occurring IAA from destruction by enzyme indole acetic acid oxidase, p-coumaric acid and phenolic acid are known to greatly synergize auxin induced root formation (Sadhu *et al.*,1978) .

**Table IV. Rootability of *Terminalia arjuna* cuttings as influenced by exogenous application of phenol (coumarin).**

**Tableau IV. Capacité de racinement de boutures de *Terminalia arjuna* sous l'influence de l'application exogène de phénol (coumarine).**

Treatments	Rooting (%)	Rooting time (days)
Traitements	Racinement (%)	Délai de racinement (jours)
Plain water / Eau	00.0 ± 0.00	00.0 ± 0.00
Coumarin 500 ppm / Coumarine 500 ppm	10.0 ± 0.96	32.75 ± 4.08
Coumarin 1000 ppm / Coumarine 1000 ppm	17.5±1.50	32.75 ± 2.88
Coumarin 3000 ppm / Coumarine 3000 ppm	33.75 ± 1.41	34.0 ± 4.78
Coumarin 5000 ppm / Coumarine 5000 ppm	07.5 ± 1.25	33.75 ± 2.88
CD at 5%/ CD à 5 %	5.05	1.75
HSD at 5% / HSD à 5 %	5.52	2.27

These findings put forth following very important and useful conclusions:-

⇒ Phenol contents have a direct positive (but not linear) correlation with rootability.

⇒ Phenol status of an accession/genotype can be taken as an indicator of its rooting potential and hence can be treated as biochemical marker of its rootability.

⇒ Modulation of the phenol contents may serve as a useful tool in inducing rooting in *T. arjuna*. Girdling, so far used for inducing rooting in air layers, can be used to produce material with higher rootability through juvenility induction. This may serve as a handy substitute to drastic pruning requirement for juvenility induction in difficult rooters.

## REFERENCES

- BOSE T.K., MUKERJEE T.P. & ROY T. (1975) Standardization under mist, effect of type of wood and size of cuttings on root formation. The Punjab Hortic. J., 15 (3&4) :139-143.
- BRAY H.G. & THORP H.V (1954) Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. Meth. Biochem Anal., 1:27-52.
- DONOHO C.W., MITCHELL A.E. & SELL H.N. (1962) Enzymatic destruction of C<sup>14</sup> labeled indole acetic acid and naphthalene acetic acid by developing apples and peach seeds. Proc. Amer. Soc.Hort. Sci.,80:43-49.

- GIROUARD R.M.(1969) Physiological and biochemical studies of adventitious root formation. Extractable rooting co-factors from *Hedera helix*. Can. Jour. Bot., 47 (5):687-99.
- HARTMANN H.T. & KESTER D.E. (1976) Anatomical and physiological basis of propagation by cuttings. In "Plant propagation principles and practices". Prentice Hall of India. Private Limited New Delhi, India.
- HESS C.E. (1962) Characterization of the rooting co-factors extracted from *Hedera helix* L. and *Hibiscus rosa sinensis* L. Proc.16<sup>th</sup> Inter. Hort. Cong., pp 382-88.
- JAMES D.J. (1979) The role of auxins and phloroglucinol in adventitious root formation in *Rubus* and *Fragaria* grown *in vitro*, Jour. Hort. Sci. 54: 273-77.
- JAMES D.J.,KNIGHT V.H. & THURBON I.J. (1980) Micropropagation of red raspberry and influence of phloroglucinol. Scient. Hort., 12: 313-19.
- JAMES D.J. & THURBAN I.J. (1981) Shoot and root induction *in vitro*, in the apple root stock M9 and promotive effect of phloroglucinol. Jour. Hort. Sci., 56:15-20.
- JONES O.P. & HOPGOOD, M.E. (1979) The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of *Prunus* the plum rootstock Pixy (*P. insititia* on the cherry root stock F 12/1 (*P. avium*) Jour. Hort. Sci., 54:63-66.
- SADHU M.K., BOSE S. & SAHA L (1978) Auxin synergistics in the rooting of mango cuttings. Scientia Horticulturae, 9:381-387.
- SADHU M.K. & BOSE S. (1982): Endogenous factors affecting rooting of mango cuttings. Proc.21 Inter. Hort. Congress. Vol.1 pp 1379.
- SINHA P.S., BECK S., JOSHI M.C., GANGOPADHYAY A., SINHA A.K., & SINHA B.R.R.P (2003) Studies on the factors controlling the pace of development of the tissues hampering the regeneration of *Terminalia arjuna*, Bedd through cuttings. Sericologia 43(4): 507-514.
- SINHA P.S. JOSHI M.C., BECK S., KHARE R., GANGOPADHYAY A., SINHA A.K., SINHA, B.R.R.P., & THANGAVELU (2001) Identification and tackling the factor, hindering the regeneration of *Terminalia arjuna* Bedd. through cuttings-A breakthrough. Sericologia 41(2):291-295.



## ASPECT BIOCHIMIQUE DE L'INDUCTION DE RACINES DANS LES BOUTURES DE POUSSES DE *TERMINALIA ARJUNA* (BEDD.), UNE PLANTE HÔTE PRIMAIRE DU VER A SOIE TASAR TROPICAL *ANTHERAEA MYLITTA* D. - ROLE DU PHENOL DANS LA FORMATION DE RACINES

P. S. SINHA, SHOVA BECK, RAM KUMAR, S. N. SINHADEO, V. N. BARDAIYAR &  
N. SURYANARYANA

Central Tasar Research and Training Institute, P. O. Piska Nagri, Ranchi, Jharkhand, Inde  
Pin – 835 303.

*Terminalia arjuna* est la plante hôte principale du ver à soie du tasar tropical, *Antheraea mylitta* D. Elle appartient à la catégorie des espèces de plantes « très difficiles à raciner ». Des expériences antérieures entreprises pendant environ quarante ans pour la régénérer par des boutures au Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi, en Inde, n'ont pas donné beaucoup de résultats. Récemment, les scientifiques de cet Institut ont été capables de mettre au point un protocole, pour régénérer cette plante. Cependant, sa simple régénération en utilisant des boutures d'arbres n'est pas encore faisable. La teneur réduite en phénol pourrait être le facteur probable responsable de la diminution du potentiel de racinement chez les plantes adultes. On sait que les composés phénoliques induisent la juvénilité et ils sont aussi connus pour leur capacité à agir de manière synergétique avec l'acide indole butyrique pour stimuler l'induction de racines. On a aussi rapporté que le rôle des composés phénoliques dans la promotion des racines pourrait agir au moins partiellement, pour protéger les auxines présentes à l'état naturel et qui induisent les racines, de la destruction par l'enzyme de l'acide indole acétique oxydase. Nous avons réalisé cette étude pour étudier la teneur en phénol de différents types de boutures de pousses provenant de sources différentes, par rapport à leur capacité de racinement et aussi pour étudier l'effet de l'application exogène de phénol sur la capacité de racinement, pour déterminer la relation entre la capacité de racinement et la teneur en phénol, afin d'exploiter cela pour mettre au point des techniques correctes de multiplication de boutures d'arbres matures de *T. arjuna*. Les résultats suggèrent que a) la teneur en phénol est corrélée directement et de manière positive avec la capacité de racinement chez *Terminalia arjuna*. b) La teneur en phénol d'une variété / d'un génotype peut être un indicateur du potentiel de racinement et on peut donc l'utiliser comme un marqueur biochimique de sa capacité de racinement. c) La modulation de la teneur en phénol pourrait servir d'outil utile pour induire le racinement. d) On peut très bien utiliser l'annélation pour produire un matériau avec une capacité de racinement plus élevée par l'induction de la juvénilité. Cela pourrait servir de pratique de remplacement de la taille pour l'induction de la juvénilité chez les plantes qui racinent difficilement. Les résultats pourraient servir de base pour mettre au point une technologie de multiplication plus rapide et plus facile.

### INTRODUCTION

Le racinement est un phénomène complexe qui est contrôlé par un certain nombre de facteurs, entre autres des facteurs génétiques, anatomiques, physiologiques et biochimiques ou la combinaison de deux facteurs ou plus (Sinha et coll., 2003). On rapporte que de nombreux facteurs internes comme

l'âge de la plante souche, les conditions nutritionnelles et hormonales de la plante, la maturité des tissus, la lumière, la température, l'eau influencent le racinement (Bose et coll., 1975). On classe les espèces de plantes par catégories, en fonction de la capacité de racinement des boutures, en tant que plantes au racinement facile et difficile, etc. *Terminalia arjuna*, une plante hôte primaire du ver à soie tasar tropical, *Antheraea mylitta* appartient à la catégorie des « espèces de plantes très difficiles à raciner » (Sinha et coll., 2003). Les expériences précédentes, réalisées au *Central Tasar Research and Training Institute*, Nagri, Ranchi en Inde de manière constante pendant les quarante dernières années pour la régénérer par des boutures n'ont pas donné de résultats majeurs (Sinha et coll., 2001). Récemment, les chercheurs de cet institut ont été capables d'identifier les raisons de l'échec du racinement et ont été capables de régénérer *T. arjuna* à raison de 88,6 % en luttant contre les obstacles (Sinha et coll., 2001) et de mettre au point un protocole pour sa régénération (Sinha et coll., 2003) ; cependant sa régénération en utilisant des boutures d'arbres matures est toujours difficile.

La diminution du potentiel de racinement alors que les plantes vieillissent pourrait être due à la baisse des niveaux phénoliques (Hartmann et Kester, 1976). On a remarqué chez certaines plantes, des niveaux plus faibles en phénol chez les formes adultes que sous leur forme juvénile (Girouard, 1969). On sait que le tri 1, 3, 5 phloroglucinol hydroxybenzène, un composé phénolique, induit la juvénilité et on sait aussi qu'il agit de manière synergétique avec l'acide indole butyrique pour stimuler l'induction de racines dans les racines souches et dans les boutures de pousses (James et Thurban, 1981). On sait qu'il stimule le racinement chez *Rubus* (James, 1979 et James et coll., 1980) et chez *Prunus* (Jones et Hopgood, 1979). Hess (1962) a trouvé que le composé phénolique, le catéchole, réagit de manière synergétique avec l'acide indole acétique pour la production de racines dans l'évaluation biologique du haricot Mung. Cependant, Donoho et coll., (1962) pensent que l'action des composés phénoliques dans la promotion de la racine pourrait agir, au moins de manière partielle, pour protéger les auxines, présentes à l'état naturel, de la destruction par l'acide indole acétique oxydase. Chez le manguié, Sadhu et Bose (1982) ont identifié trois acides phénoliques, c'est-à-dire l'acide féruléique, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide p-coumarique dans les extraits de tissus de la tige et chacun de ces acides phénoliques, a un effet synergétique sur la formation de racines induites par les auxines (Sadhu et coll., 1978). Ces résultats suggèrent clairement le rôle des phénols dans l'induction de racines avec les boutures de pousses. Nous avons donc entrepris cette étude, dans ce contexte, pour étudier les teneurs en phénol de différents types de boutures de pousses, provenant de sources différentes, par rapport à leur capacité de racinement et aussi pour étudier l'effet de l'application exogène de phénol sur la capacité de racinement des boutures de tiges afin d'établir une relation entre la capacité de racinement et le phénol, afin de l'exploiter dans le but d'obtenir un racinement plus important pour une multiplication à grande échelle de génotypes supérieurs et aussi pour diminuer la longue période de gestation de la plantation de *T. arjuna* pour l'élevage du ver à soie tasar.

## MATERIELS ET METHODES

L'étude comprend la détermination des teneurs en phénol et de la capacité de racinement de boutures de nœuds de feuille de *T. arjuna* provenant des groupes suivants :

- différents types de plantation, c'est-à-dire buissons, taille moyenne et arbres
- différents types de branches, c'est-à-dire primaires, secondaires ou tertiaires avec et sans incision. On utilise des branches qui germent à la fois en dessous et au-dessus des incisions.
- différents endroits de la même branche.
- différentes variétés.

On détermine la teneur en phénol d'après la méthode de Bray et Thorp (1954).

Pour l'étude de la capacité de racinement, on plante 60 boutures à raison de 20 boutures / répétition dans des sacs en plastique de 30 × 10 cm, remplis de sable stérile. On conserve les sacs en plastique dans des trous dans le sol de 2 m × 1 m × 1 m et on les recouvre avec des feuilles de polyéthylène



transparent. On vaporise les boutures et les parois des trous avec de l'eau, deux à trois fois par jour, pour maintenir les niveaux d'humidité autour de 80 %. On procède à des observations régulières sur l'induction de racines.

En plus de cela, on étudie aussi l'efficacité de l'application exogène d'un phénol, en l'occurrence, la coumarine, pour induire la capacité de racinement. On taille les arbres de plus de 25 ans à 180 cm de hauteur et on vaporise les bourgeons avec quatre concentrations différentes de solution aqueuse de coumarine, trois fois, à trois jours d'intervalle. On vaporise les lots témoins avec de l'eau. On utilise les branches, qui se sont développées comme boutures pour la multiplication et on étudie leur capacité de racinement en fonction de la méthode décrite ci-dessus.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sur la teneur en phénol et sur la capacité de racinement sont présentées dans les Tableaux I, II et III et dans la fig. 1. Les données qui appartiennent à l'application exogène de phénol sur le racinement sont présentées dans le Tableau IV.

### **i) Variation de la teneur en phénol et de la capacité de racinement en fonction de l'âge et de la forme du plant mère :**

Le Tableau I indique que la teneur en phénol est plus élevée dans les plantules, suivies par les jeunes plants < les petits buissons < les arbres maintenus à 180 cm de hauteur et moins importante chez les arbres adultes. Les plantules de trois mois présentent une teneur en phénol 378,3 % plus importante que celle des arbres adultes. La teneur en phénol baisse avec l'âge du plant ainsi qu'avec la maturité. Les plants maintenus sous forme de buissons, ont une teneur plus élevée en phénol, que ceux qui sont maintenus à taille moyenne et que ceux qui sont maintenus comme arbres, ce qui indique que la capacité de racinement varie presque dans le même ordre. Elle est maximum chez les plantules et minimum chez les arbres adultes. On constate aussi que plus d'une unité (mg / g de poids frais) de teneur en phénol est propice à l'amorce des racines, une teneur en phénol entre 0,5 et 0,6 unités peut juste faire démarrer le racinement, tandis qu'en dessous de 0,5 unités, cela n'induit pas le racinement. On constate que le délai de racinement est plus long pour le matériau buissons / arbres que pour les jeunes plants et les plantules.

### **ii) Variation de la teneur en phénol avec le type de branches et d'incisions :**

Le Tableau II représente la variation de la teneur en phénol, en fonction du type de branche et de sa position par rapport à l'incision. La teneur en phénol est plus élevée dans les branches primaires, suivies par les branches secondaires et tertiaires. On constate que les branches primaires ont 47,7 % de phénol en plus que les branches tertiaires. L'incision peut améliorer la situation du phénol dans la branche. Les branches incisées présentent invariablement plus de teneur en phénol que les branches non incisées. De plus, la teneur en phénol en dessous et au-dessus de l'incision n'est pas la même et est plus élevée en dessous des incisions. La teneur en phénol se situe dans l'ordre en dessous de l'incision > au-dessus de l'incision > sans incision. Les branches primaires en dessous de l'incision s'avèrent avoir le maximum de phénol et même les branches secondaires et tertiaires en dessous des incisions ont plus de phénol. Là aussi, la capacité de racinement suit presque la même tendance, ce qui indique que la teneur en phénol est associée avec le racinement. Plus la teneur en phénol est élevée plus le racinement et la teneur en phénol semblent avoir un niveau seuil puisqu'en dessous de 0,4 unités, on n'observe aucun racinement, entre 0,4 et 0,6 unités, on observe un racinement nominal (approximativement 4 %) et au-dessus de 0,7 unités, le racinement est de l'ordre de 25 % ou plus, et il atteint un niveau de 41,25 % avec l'augmentation de la teneur en phénol jusqu'à 1,391 unités.

Les branches qui sont situées en dessous des incisions ont invariablement une teneur plus élevée en phénol que celles situées au-dessus de la partie incisée.



**iii)Variation de la teneur en phénol de la partie apicale à la partie basale de la branche :**

La fig. 1 présente la variation de la teneur en phénol de la même branche, du nœud apical au 10<sup>ème</sup> nœud. Il se produit une baisse progressive de la teneur en phénol de la partie apicale à la partie basale, c'est-à-dire que le 9<sup>ème</sup> - 10<sup>ème</sup> nœud a 228,8 % moins de phénol que le nœud apical. Là aussi, la partie apicale présente un racinement plus élevé et il baisse à nouveau, de la partie apicale à la partie basale, ce qui suggère une relation entre les deux.

**iv)Variation de la teneur en phénol chez différentes variétés :**

Le Tableau III suggère une variation de la teneur en phénol chez 13 variétés différentes, en fonction de leur capacité de racinement. La teneur en phénol des variétés varie de 0,281 à 1,450. La capacité de racinement varie de 0 à 77,5 %. Les variétés ayant une teneur plus élevée en phénol présentent, invariablement, un racinement plus élevé, ce qui suggère qu'il y a une relation entre les deux.

**Corrélation entre la teneur en phénol et le racinement :**

La fig. 2 présente la corrélation entre la teneur en phénol et le racinement. On constate une amélioration du racinement avec l'augmentation de la teneur en phénol, ce qui suggère une corrélation directe et positive. Cependant, la relation n'est pas linéaire. La relation non linéaire pourrait être due au fait que la composition phénolique de tous les traitements pourrait ne pas être la même et que des phénols différents n'ont pas le même effet.

**Influence de l'application exogène de phénol sur le racinement :**

L'influence de l'application exogène de phénol sur le racinement est présentée dans le Tableau IV. On constate que la vaporisation de solution de coumarine sur les rejets obtenus par la taille, induit le racinement chez les branches qui se sont développées à partir de ces rejets. Le degré de racinement augmente avec l'augmentation de la concentration de coumarine, jusqu'à 3000 ppm, et l'augmentation supplémentaire de la concentration de coumarine fait baisser le racinement.

Les résultats précédents suggèrent clairement que la teneur en phénol a un rôle définitif sur l'induction des racines. Hartmann et Kester (1976) ont imputé la diminution du potentiel de racinement des plants à la diminution de la teneur en phénol. Les composés phénoliques améliorent le racinement, soit en agissant de manière synergétique avec l'IAA (Hess, 1962) ou par la protection de l'IAA, qui existe à l'état naturel et qui induit les racines, de la destruction par l'acide indole acétique oxydase, on sait que l'acide p-coumarique et que l'acide phénolique ont un effet synergétique important sur la formation de racines induites par les auxines (Sadhu et coll., 1978).

Ces résultats mettent en avant des conclusions très utiles et importantes, qui sont les suivantes :

⇒ La teneur en phénol est corrélée positivement (mais non linéairement) avec la capacité de racinement.

⇒ On peut prendre la teneur en phénol d'une variété / d'un génotype, comme un indicateur du potentiel de racinement et on peut donc le traiter comme marqueur biochimique de sa capacité de racinement.

⇒ La modulation de la teneur en phénol pourrait servir d'outil utile pour induire le racinement chez *T. arjuna*. Les incisions utilisées jusqu'à présent pour induire le racinement dans les couches aériennes, peuvent être utilisées pour produire un matériau, avec une capacité de racinement plus élevée, par l'induction de la juvénilité. Cela pourrait servir d'alternative pratique au besoin radical de taille, pour l'induction de la juvénilité, chez les plantes à racinement difficile.

## A COMPARATIVE BIOCHEMICAL STUDY OF HAIRY AND NON-HAIRY LEAVES OF *TERMINALIA TOMENTOSA*

U. S. P. SINHA\*, A.K.SINHA & N. SURYANARAYANA

Central Tasar Research and Training Institute, P.O.-Piska Nagri, Ranchi- 835303, Jharkhand (India)

*Hairy and non-hairy leaves of Terminalia tomentosa, a primary food plant of tropical tasar silkworm Antheraea mylitta Drury were analyzed for six important biochemical constituents i. e., moisture, total mineral, crude fibre, total carbohydrate, crude protein and amino acids. From analysis of the data for ranking of the leaves on the basis of above biochemical constituents, it was found that non-hairy leaves of T. tomentosa are better than hairy leaves of T. tomentosa.*

**Keywords:** *Terminalia tomentosa*, Hairy, Non-hairy, Comparative, Biochemical.

### INTRODUCTION

Biochemical analysis is one of the diagnostic techniques employed for evaluating nutrients status of both flora and fauna. Tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury is a polyphagous insect which has been exploited commercially by rearing on three primary food plants i. e., *Terminalia tomentosa*, *Terminalia arjuna* and *Shorea robusta* (Jolly *et al.*, 1968). Out of these three food plants, *T. tomentosa* has two types of leaves - hairy and non-hairy. Constituents of the leaves on which the silkworms feed have effect on their survival and health (Sinha *et al.*, 1986). A high nutritive value in the leaf increases the resistance of silkworms as well as cocoon quality and production. Several studies have shown the importance of quality of mulberry leaves in silkworm rearing (Bianchidi, 1955 and Abdullaev *et al.*, 1964). It was, therefore, thought worthwhile to do a comparative biochemical study of hairy and non-hairy leaves of *T. tomentosa* in order to evaluate their nutritional values.

### MATERIALS AND METHODS

Simple Random Sampling method was followed for collecting the leaf samples of hairy and non-hairy leaves after 90 days of pruning in five replications from the experimental field. All the biochemical constituents of leaves except moisture were determined on oven dry basis. Moisture, total mineral, total carbohydrate and crude fibre were estimated by the method of AOAC (1955). Kjeldahl's method as described by Vogel (1978) was followed for the determination of total nitrogen. Crude protein was calculated by multiplying the estimated value of the nitrogen content by 6.25.

For the estimation of amino acids, powdered moisture free dry leaf samples were digested with 6N HCl at 110°C for 24 hours to hydrolyze the bound amino acids into free amino acids. The contents were then centrifuged at 3,000 r.p.m. for 10 min. The supernatant liquid was decanted in a porcelain basin. The solid residue was thoroughly leached several times with 5 ml portions of distilled water till the aqueous washing after centrifugation was negative to ninhydrin test. The decanted liquid and

\* Author to whom correspondence may be addressed.

the aqueous washings were evaporated to dryness on a water bath to get rid of hydrogen chloride. The residue was treated with distilled water (5ml) and the resulting solution was evaporated to dryness on a water bath again. This process was repeated till the residue was free from hydrochloric acid. The residue was then extracted with 1 ml portion of ether to remove lipids. Finally lipids free residue was extracted with isopropanol (10%, V/V) and the extract was used for separation and estimation of amino acids by paper chromatography following the two dimensional technique of Datta *et al.*, (1950) using n-butanol-acetic acid-water (4:1:5, V/V upper layer) and Phenol-water (4:1, W/V) as solvents. Amino acids were located by spraying the chromatograms with ninhydrin solution (0.5%, W/V in acetone) and heating them at 100° C for 30 min. and identified by different spray reagents (Pant and Agarwal, 1965) as well as by comparison with Rf- values of authentic amino acids run under identical conditions. For quantitative estimation of individual amino acids, the method of Price (1963) was followed. Method as suggested by Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) was followed to decide the ranking of the leaves in respect of biochemical constituents under study.

## RESULTS AND DISCUSSION

Data presented in Table I showed mean values of biochemical constituents of hairy and non-hairy leaves of *T. tomentosa*. It is evident from the table that hairy and non-hairy leaves behave equally in respect of moisture content. Both types of leaves contain above 70% moisture content (Hairy-71.04% & Non-hairy-72.37%). High moisture content in the leaves has favourable effects on the palatability and assimilability of nutrients and serves as criteria in estimating the leaf quality (Parpiev, 1968). Both types of leaves of *T. tomentosa* are desirable as regard to this character since 70% moisture content and more is opined to be optimum for silkworm rearing (Jolly and Dandin, 1986).

Bose *et al.*, (1995) reported that succulent mulberry leaves with less fibre and higher mineral contents stimulate the metabolic activities in silkworm resulting in quantitative improvement of cocoon and silk. Non-hairy leaves are better than hairy leaves in this respect because it contains higher total mineral (9.40%) and lower crude fibre (9.75%) contents than hairy leaves (Total mineral – 7.10 %, Crude fibre -12.75%).

Carbohydrate occupies a very important place especially in case of phytophagous insects. It is the most commonly distributed and widely occurring compounds in plants with enormous variations in their quantity and quality. Carbohydrates are utilized by the insects as an energy source and for synthesis of both lipids and amino acids (Horie *et al.*, 1978). The degree of fat body glycogen and haemolymph trehalose is also dependent on the carbohydrate contents in diet of silkworm. Total carbohydrate content has been found significantly higher in non-hairy leaves (20.60%) than hairy leaves (18.90%) of *T. tomentosa*.

The role of protein in silkworm nutrition has been emphasized by Fukuda *et al.*, (1959) & Takeuchi (1960). It is the most ubiquitous organic nitrogenous compound in the food stuff of silkworm larvae which are involved practically in all the structure and function of the cells. Machii and Katagiri (1991) reported that mulberry varieties containing higher contents of protein in leaves have higher production efficiency of cocoon shell (PECS). Crude protein content is significantly higher in non-hairy leaves (14.44%) than hairy leaves (13.50%).

Amino acids are the most important constituents in silkworm nutrition (Ito, 1967). Amino acids obtained from the leaf are utilized by the silkworm for body growth, development and cocoon formation. The mean values of concentration of amino acids in hairy and non-hairy leaves of *T. tomentosa* have been depicted in Table II. It is evident from Table II that twenty three amino acids i. e., Cysteic acid, aspartic acid, glycine, glutamic acid, serine, lysine, threonine, arginine,  $\alpha$ -alanine, glutamine, tyrosine,  $\beta$ -alanine, histidine, methionine sulphoxide, proline, methionine, valine, phosphoserine, leucine/ isoleucine, phenyl alanine, asparagine,  $\alpha$ -amino adipic acid and cysteine are present in both types of leaves.



**Table I. Mean values of biochemical constituents of hairy and non-hairy leaves of *T. tomentosa*.**  
**Tableau I. Valeurs moyennes pour les constituants biochimiques des feuilles velues et non velues de *T. tomentosa*.**

Sl.No	Biochemical Constituents	Hairy leaves	Non-hairy leaves	Calculated 't' value	Conclusion
No. de série	Constituants biochimiques	Feuilles velues	Feuilles non velues	Valeur "t" calculée	
1.	Moisture (%) / Humidité (%)	71.04	72.37	2.070	NS
2.	Total mineral (%) Ensemble des minéraux (%)	7.10	9.40	10.186	***
3.	Crude fibre (%) / Fibres brutes (%)	12.75	9.75	9.551	***
4.	Total carbohydrate (%) Ensemble des hydrates de carbone (%)	18.90	20.60	4.993	**
5.	Crude protein (%) Protéines brutes (%)	13.50	14.44	1.951	NS
6.	Total amino acid (µg/g dry leaf) Acides aminés totaux (µg / g de feuille sèche)	53,250	60,000	16.124	***

NS - Not Significant / Non significatif.

\*\* - Significant at 1% level / Significatif au seuil de 1 %

\*\*\* - Significant at 0.1% level / Significatif au seuil de 0,1 %.

Concentration of glycine, glutamine and phenyl alanine are significantly higher in hairy leaves, the rest of amino acids showed significantly higher values in non-hairy leaves except cysteic acid, aspartic acid, serine,  $\beta$ -alanine, proline, valine and cysteine, the concentration of which are at par in both hairy and non-hairy leaves. The highest concentration of  $\alpha$ -alanine and the lowest concentration of cysteine have been found in both types of leaves.

Dhavalikar (1962) has reported the presence of 17 amino acids namely glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, glutamic acid, tyrosine, phenyl alanine, lysine, histidine, arginine, proline, tryptophan and cysteine in tasar silk. In the hairy and non-hairy leaves of *T. tomentosa* except tryptophan, all the above mentioned amino acids are found present. Absence of tryptophan may be due to its destruction during the course of acid hydrolysis of the leaf samples. This observation corroborates with that of Sinha & Sinha (1991) who also reported the absence of tryptophan in *M. bombycina* and *L. polyantha*, the primary food plants of muga silkworm after acid hydrolysis of the leaf, although the presence of above amino acids in muga silk was reported by Dhavalikar (1962). Eight amino acids i.e. Cysteic acid, glutamine,  $\beta$ -alanine, methionine sulphoxide, methionine, phosphoserine, asparagine and  $\alpha$ -amino adipic acid which are absent in tasar silk have

been found present in the hairy and non-hairy leaves of *T. tomentosa*. Thus, it may be inferred that these amino acids are not involved in the synthesis of silk by tasar larvae. Though the number of amino acids is same in hairy and non-hairy leaves of *T. tomentosa*, non-hairy leaves contain significantly higher quantities of amino acids (60,000 µg/g dry leaf) than hairy leaves (53,250 µg/g dry leaf).

**Table II. Mean values of concentration of amino acids (µg/g dry leaf) in hairy and non-hairy leaves of *T. tomentosa*.**

**Tableau II. Valeurs moyennes pour la concentration en acides aminés (µg / g de feuille sèche) chez les feuilles velues et non velues de *T. tomentosa*.**

Sl. No.	Amino acid	Hairy leaves	Non-hairy leaves	Calculated 't' value	Conclusion
No. de série	Acide aminé (µg/g)	Feuilles velues (µg/g)	Feuilles non velues (µg/g)	Valeur "t" calculée	
1.	Cystic acid / <i>Acide cystéique</i>	1150	1100	1.291	NS
2.	Aspartic acid / <i>Acide aspartique</i>	2700	2750	1.054	NS
3.	Glycine	4500	4300	5.164	***
4.	Glutamic acid / <i>Acide glutamique</i>	1350	1650	8.485	***
5.	Serine / <i>Sérine</i>	4500	4500	0.000	NS
6.	Lysine	3500	4000	11.180	***
7.	Threonine	1750	2000	5.270	***
8.	Arginine	2650	3250	16.971	***
9.	α-alanine	6000	6250	4.564	**
10.	Glutamine	1350	1200	3.000	*
11.	Tyrosine	1200	1400	4.000	**
12.	β- alanine	1400	1400	0.000	NS
13.	Histidine	2750	2900	5.477	***
14.	Methionine sulphoxide	1000	1150	2.739	*
15.	Proline	1150	1100	1.414	NS
16.	Methionine	3300	3950	13.000	***
17.	Valine	2000	2000	0.000	NS
18.	Phosphoserine	1100	1250	2.739	*
19.	Leucine/ isoleucine	3300	4100	17.889	***
20.	Phenylalanine	4250	3500	17.928	***
21.	Asparagine	800	1250	6.211	***
22.	α-amino adipic acid	800	4250	72.732	***
23.	<i>Acide α- amino adipique</i> Cysteine	750	750	0.000	NS
	TOTAL	53,250	60,000	16.124	***

NS – Not Significant / *Non significatif*.

\* - Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %*, \*\* - Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %*.

\*\*\* - Significant at 0.1% level / *Significatif au seuil de 0,1 %*.

**Table III. Scores allotted to non-hairy and hairy leaves of *T. tomentosa* for six biochemical constituents.**

**Tableau III. Classements accordés aux feuilles velues et non velues de *T. tomentosa* pour six constituants biochimiques.**

Types of leaves	Moisture	Total mineral	Crude fibre	Total carbohydrate	Crude protein	Amino acid	Total scores	Rank
Type de feuilles	Humidité	Ensemble des minéraux	Fibres brutes	Ensemble des hydrates de carbone	Protéines brutes	Acide aminé	Résultats totaux	Classement
Non-hairy leaves of <i>T. tomentosa</i> Feuilles non velues de <i>T. tomentosa</i>	1.00	0.50	0.50	0.50	1.00	0.50	4.00	I
Hairy leaves of <i>T. tomentosa</i> . Feuilles velues de <i>T. tomentosa</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	6.00	II

Data on Table III indicates the scores allotted to non-hairy and hairy leaves of *T. tomentosa* for six aforesaid biochemical constituents, by the method of Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) where lower score signifies higher ranking. It is evident from this table that non-hairy leaves of *T. tomentosa* are better than hairy leaves of *T. tomentosa* in respect of the biochemical constituents studied.

Thus from the present study, it is inferred that non-hairy leaves of *T. tomentosa* are better than hairy leaves of *T. tomentosa* in respect of the biochemical constituents taken into consideration.

## REFERENCES

- ABDULLAEV I.K., GASANOV D.O., IMAMKULVER S.D. (1964) Hybrid mulberry in Azerbaijan and its importance in breeding. Trans Azerbaijan Sci. Silk Prod. Russia, 5, 132-153.
- ARUNACALAM V. AND BANDYOPADHYAY A. (1984) A method to make decisions jointly on a number of dependent characters. Indian J. Genet., 44(3), 419-424.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC) (1955) Official methods of analysis, 8<sup>th</sup> edition, Washington, 99, 373, 118-119, 368.
- BIANCHIDI A. (1955) The new kokuso varieties of Japanese mulberry. G. Agric. Domin., Italy, 39, 582.
- BOSE P.C., SINGHVI N.R. & DUTTA R.K. (1955) Effect of micronutrients on the biochemical parameters of mulberry (*Morus alba* L.) leaf. Sericologia, 35(1), 65-69.
- DATTA S.P., DENT C.E. & HARRIS H. (1950) An apparatus for the simultaneous production of many two dimensional paper chromatograms, Science, 112, 621.
- DHAVALIKAR R.S. (1962) Amino acids composition of Indian Silk Fibroins and Sericins. Journal of Scientific and Industrial Research, 21C, 261-263.



- FUKUDA T., SUDAM M., MATSUDA M., MAYASHI T., KUROSO T., HORIUSHI Y. & FLORRIN M. (1959) Formation of the silk protein during the growth of the silkworm, *Bombyx mori* L., *Biochem.*, 12, 90-112.
- HORIE Y., INOKUCHI T. & WATANBE K. (1978) Quantitative study of food utilization by the silkworm *Bombyx mori* L. through its life cycle. II Economy of nitrogen and amino acid, *Bull. Seric. Exp. Stn. Jpn.* 27, 531-578.
- ITO T. (1967) Nutritional requirement of the silkworm, *Bombyx mori*, *Proc. Jpn. Acad.*, 43, 57-61.
- JOLLY M.S., CHATURVEDI S.N., PRASAD S. (1968) A survey of tasar crops in India. *Indian J. Seric.* 7(1), 56-57.
- JOLLY M.S. & DANDIN S.B. (1986) Collection, conservation and evaluation of mulberry (*Morus* spp.) Germplasm. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, 44.
- MACHII H. & KATAGIRI K. (1991) Varietal differences in nutritive values of mulberry leaves for rearing silkworms. *JARQ*, 25(3), 202-208.
- PRICE G.M. (1963) The effect of anoxia on metabolism in adult housefly, *M. domestica*. *Biochem. J.* 86, 372.
- PANT R. & AGRAWAL H.C. (1965) Changes observed in the free amino acid content in *Philosamia ricini* pupal haemolymph during metamorphosis. *Ind. J. Expt. Biol* 3: 133-136.
- PARPIEV B.A. (1968) Water metabolism in silkworm fed with a different mulberry strains changing diet *Shell*, 39, 15-17.
- SINHA A.K., CHAUDHARY S.K., BRAHMACHARI B.N. & SENGUPTA K. (1986) Foliar constituents of the food plants of temperature tasar silkworm *Antheraea proylei*. *Indian J. Seric.*, 25 (1), 42-43.
- SINHA A. K. & SINHA S.S. (1991) Amino acids in the leaves of primary food plants of muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood. *Indian J. Seric.*, 30 (2), 159-160.
- TAKEUCHI Y. (1960) Ability of silkworm (*Bombyx mori* L.) to recover from malnutrition. *The silk News Letter*, 5 (8), 6-7.
- VOGEL A. I. (1978) A text book of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis, 4<sup>th</sup> edition, Longman Group Ltd., London, 926 p.

## ETUDE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DES FEUILLES VELUES ET NON VELUES DE *TERMINALIA TOMENTOSA*

U. S. P. SINHA\*, A. K. SINHA & N. SURYANARAYANA

Central Tasar Research and Training Institute, P. O. Piska Nagri, Ranchi - 835 303, Jharkhand  
(Inde).

*On a analysé six constituants biochimiques importants, c'est-à-dire l'humidité, l'ensemble des minéraux, les fibres brutes, l'ensemble des hydrates de carbone, les protéines brutes, et les acides aminés des feuilles velues et non velues de Terminalia tomentosa, une plante hôte primaire du ver à soie tropical Antheraea mylitta Drury. D'après l'analyse des données pour classer les feuilles, sur la base des constituants biochimiques ci-dessus, on observe que les feuilles non velues de T. tomentosa sont meilleures que les feuilles velues de T. tomentosa.*

### INTRODUCTION

L'analyse biochimique est l'une des techniques de diagnostic employées pour évaluer l'état des nutriments à la fois de la flore et de la faune. Le ver à soie tropical du tasar, *Antheraea mylitta* Drury est un insecte polyphage, que l'on a exploité commercialement, en l'élevant sur trois plantes hôtes principales, c'est-à-dire *Terminalia tomentosa*, *Terminalia arjuna* et *Shorea robusta* (Jolly et coll., 1968). Sur ces trois plantes hôtes, *T. tomentosa* présente deux types de feuilles, des feuilles velues et non velues. Les constituants des feuilles sur lesquelles les vers à soie se nourrissent ont un effet sur leur survie et sur leur santé (Sinha et coll., 1986). Une valeur nutritive élevée de la feuille augmente la résistance des vers à soie, ainsi que la qualité et la production de cocons. Plusieurs études ont montré l'importance de la qualité des feuilles de mûrier dans l'élevage du ver à soie (Bianchidi, 1955 et Abdullaev et coll., 1964). On a donc pensé qu'il serait utile de faire une étude biochimique comparative des feuilles velues et non velues de *T. tomentosa* pour évaluer leurs valeurs nutritives.

### MATERIELS ET METHODES

On suit une méthode d'échantillonnage aléatoire simple pour recueillir les échantillons de feuilles velues et non velues en cinq répétitions sur le terrain expérimental, 90 jours après la taille. On détermine tous les constituants biochimiques des feuilles sauf l'humidité, sur la base du séchage au four. On estime l'humidité, l'ensemble des minéraux et des hydrates de carbone et des fibres brutes d'après la méthode d'AOAC (1955). On suit la méthode de Kjeldal d'après la description de Vogel (1978) pour la détermination de l'azote total. On calcule les protéines brutes en multipliant la valeur estimée de la teneur en azote par 6,25.

Pour l'estimation des acides aminés, on digère des échantillons de feuille sèche, réduits en poudre avec 6N d'HCL à 110° C pendant 24 heures pour hydrolyser les acides aminés liés en acides aminés libres. Puis, on centrifuge le contenu à 3000 r.p.m. pendant 10 min. On décante le surnageant liquide dans un récipient en porcelaine. On filtre soigneusement le résidu solide plusieurs fois avec des

\* Auteur auquel adresser la correspondance.

fractions de 5 ml d'eau distillée, jusqu'à ce que le lavage aqueux après la centrifugation soit négatif avec le test ninhydrine. On évapore le liquide décanté et les lavages aqueux dans un bain marie jusqu'à ce qu'ils soient secs pour se débarrasser du chlorure d'hydrogène. On traite le résidu avec de l'eau distillée (5 ml) et on évapore la solution qui en résulte à nouveau dans un bain marie jusqu'à ce qu'elle sèche. On répète le processus jusqu'à ce que le résidu soit débarrassé de l'acide chlorhydrique. Puis, on extrait le résidu avec un 1 ml d'éther pour enlever les lipides. Enfin, on extrait le résidu sans lipides avec de l'isopropanol (10 % V/V) et on utilise l'extrait pour la séparation et l'estimation des acides aminés par chromatographie sur papier en suivant une technique à deux dimensions de Datta et coll., (1950) en utilisant n-butanol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5, V/V couche supérieure) et phénol - eau (4 : 1, W / V) comme solvants.

On localise les acides aminés en vaporisant les chromatogrammes avec une solution de ninhydrine (0,5 %, W/V dans de l'acétone) et en les chauffant à 100° C pendant 30 min et on les identifie par la vaporisation de différents réactifs (Pant et Agarwal, 1965) ainsi que par la comparaison avec les valeurs Rf d'acides aminés témoins, obtenues dans des conditions identiques. Pour l'estimation quantitative des acides aminés individuels, on suit la méthode de Price (1963) pour établir le classement des feuilles par rapport aux constituants biochimiques étudiés.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les données présentées dans le Tableau I montrent les valeurs moyennes pour les constituants biochimiques des feuilles velues et non velues de *T. tomentosa*. Il est évident d'après le tableau que les feuilles velues et non velues se comportent de la même manière pour la teneur en humidité. Les deux types de feuilles contiennent plus de 70 % d'humidité (velues 71,04 % et non velues 72,37 %). La teneur élevée en humidité dans les feuilles a des effets favorables sur la comestibilité et sur l'assimilation des nutriments et sert de critère pour estimer la qualité de la feuille (Parpiev, 1968). Pour ce caractère, les deux types de feuilles de *T. tomentosa* sont favorables puisqu'on estime qu'une teneur en humidité de 70 % ou plus est optimum pour l'élevage du ver à soie (Jolly et Dandin, 1986).

Bose et coll., (1995) ont rapporté que des feuilles de mûrier avec moins de fibres et des teneurs plus élevées en minéraux stimulent les activités métaboliques du ver à soie, en entraînant une amélioration quantitative en matière de cocons et de soie. A cet égard, les feuilles non velues sont meilleures que les feuilles velues, parce qu'elles contiennent plus de minéraux totaux (9,40 %) et moins de fibres brutes (9,75 %) que les feuilles velues (minéraux totaux - 7,10 %, fibres brutes - 12,75 %).

Les hydrates de carbone occupent une place très importante surtout dans le cas des insectes phytophages. Ce sont les composés les plus couramment distribués et les plus présents dans les plantes avec des variations énormes en quantité et en qualité. Les insectes utilisent les hydrates de carbone comme source d'énergie et pour la synthèse à la fois des lipides et des acides aminés (Horie et coll., 1978). Le degré de glycogène du corps gras et du tréhalose de l'hémolymphe dépendent aussi de la teneur en hydrates de carbone dans l'alimentation du ver à soie. Il s'avère que la teneur en hydrates de carbone totaux est significativement plus élevée dans les feuilles non velues (20,60 %) que dans les feuilles velues (18,90 %) de *T. tomentosa*.

Fukuda et coll., (1959) et Takeuchi (1960) ont souligné le rôle des protéines dans la nutrition du ver à soie. Ce sont les composés azotés organiques les plus présents dans l'alimentation des larves de vers à soie, qui sont impliqués pratiquement dans toute la structure et la fonction de la cellule. Machii et Katagiri (1991) ont rapporté que les variétés de mûrier qui contiennent des teneurs plus importantes en protéines dans les feuilles ont une efficacité de production de coques soyeuses (PECS) plus importante. La teneur en protéines brutes est significativement plus élevée dans les feuilles non velues (14,44 %) que dans les feuilles velues (13,50 %).



Les acides aminés sont les constituants les plus importants dans la nutrition du ver à soie (Ito, 1967). Le ver à soie utilise les acides aminés dérivés de la feuille pour sa croissance et son développement corporels et pour la formation des cocons. Les valeurs moyennes pour la concentration en acides aminés dans les feuilles velues et non velues de *T. tomentosa* sont présentées dans le Tableau II. Il est évident d'après le Tableau II que vingt trois acides aminés, c'est-à-dire l'acide cystéique, l'acide aspartique, la glycine, l'acide glutamique, la sérine, la lysine, la thréonine, l'arginine, l' $\alpha$ -alanine, la glutamine, la tyrosine, la  $\beta$ -alanine, l'histidine, la méthionine la sulfoxyde, la proline, la méthionine, la valine, la phosphoserine, la leucine / isoleucine, la phénylalanine, l'asparagine, l'acide  $\alpha$ -amino adipique et la cystéine sont présents dans les deux types de feuilles.

Les concentrations en glycine, en glutamine et en phénylalanine sont significativement plus élevées dans les feuilles velues, le reste des acides aminés présente des valeurs significativement plus élevées dans les feuilles non velues sauf l'acide cystéique, l'acide aspartique, la sérine, la  $\beta$ -alanine, la proline, la valine et la cystéine, dont les concentrations sont identiques dans les feuilles velues et non velues. La concentration en  $\alpha$ -alanine est la plus élevée et la concentration en cystéine est la plus faible dans les deux types de feuilles.

Dhavalikar (1962) a rapporté la présence de 17 acides aminés à savoir la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la sérine, la thréonine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la tyrosine, la phénylalanine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la proline, le tryptophane et la cystéine dans la soie tasar. Dans les feuilles velues et non velues de *T. tomentosa*, tous les acides aminés mentionnés ci-dessus sont présents. L'absence de tryptophane, pourrait être due à sa destruction au cours de l'hydrolyse acide des échantillons de feuilles. Cette observation concorde avec celle de Sinha et Sinha (1991) qui ont aussi rapporté l'absence de tryptophane chez *M. bombycina* et *L. polyantha*, les plantes hôtes primaires du ver à soie muga après l'hydrolyse acide de la feuille, bien que Dhavalikar (1962) ait rapporté la présence des acides aminés en question dans la soie muga. On a trouvé huit acides aminés, c'est-à-dire, l'acide cystéique, la glutamine, la  $\beta$ -alanine, la méthionine sulfoxyde, la méthionine, la phosphosérine, l'asparagine et l'acide amino adipique  $\alpha$ , qui sont absents de la soie tasar, dans les feuilles velues et non velues de *T. tomentosa*. On peut donc en déduire que ces acides aminés ne sont pas impliqués dans la synthèse de la soie par les larves tasar. Bien que le nombre d'acides aminés soit le même dans les feuilles velues et non velues de *T. tomentosa* ; les feuilles non velues contiennent des quantités significativement plus élevées d'acides aminés (60 000  $\mu\text{g} / \text{g}$  de feuilles sèches) que les feuilles velues (53,250  $\mu\text{g} / \text{g}$  de feuille sèche).

Les données du Tableau III indiquent les résultats attribués aux feuilles non velues et velues de *T. tomentosa* pour les six constituants biochimiques mentionnés plus haut, par la méthode d'Arunachalam et Bandyopadhyay (1984) où la note la plus basse signifie le classement le plus élevé. Il est évident d'après ce tableau que les feuilles non velues de *T. tomentosa* sont meilleures que les feuilles velues de *T. tomentosa* pour les constituants biochimiques étudiés.

D'après cette étude, nous en déduisons donc que les feuilles non velues de *T. tomentosa* sont meilleures que les feuilles velues de *T. tomentosa* pour les constituants biochimiques pris en considération.

## IN VITRO INDUCTION AND PROLIFERATION OF CALLUS OF *SHOREA ROBUSTA* G (SAL)

P. K. TEWARY, M. K. SINGH & N. SURYANARAYANA

Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi-835303, Jharkhand, India

*Callus of Shorea robusta G. was initiated and maintained from leaf explants, first soaked in MS liquid medium supplemented with BAP, Kn and 2,4-D, then cultured subsequently on semi-solid medium of same composition. Browning of callus was observed due to phenolic accumulation after certain age. 2,4-D + Kn was found suitable for long term callus culture and the growth rate revealed increasing growth indices with ageing of callus. Growth was found maximum in about 4 months duration.*

**Keywords :** *Shorea robusta* G., leaf, callus.

### INTRODUCTION

During recent years tissue culture has been extensively tried in economically important tree species. *Shorea robusta* G. is one of the economic important trees which is known not only for timber but also for extensive tasar culture. It is the prime host plant of tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. One of the most economic ecorace of *Antheraea mylitta* D "Raily" feeds on the foliage of *Shorea robusta*. The taxa is available world wide chiefly in the districts of Madhya Pradesh and Chattisgarh in India. Although *Shorea robusta* is a tall tree, however, we maintain it at human height level in order to do effective rearing of tasar silkworm. Apart from *Shorea robusta*, different species of *Terminalia* i. e. *T. arjuna*, *T. tomentosa*, *T. chebula*, *T. belerica* are the chief host plant of different ecoraces of *Antheraea mylitta* D. There are several other secondary and tertiary host plants of this silkworm.

Very scanty, almost nil, reports are available for tissue culture of *Shorea robusta* G. An attempt has been made by Jain and Chaturvedi (2002) to induce tissue culture plants of *Shorea robusta* G., however, there was no follow-up afterwards. Other tree plants related to sericulture have been attempted successfully i.e., *Morus alba* (Mulberry) by Tewary and Oka (1999) to develop a suitable and reproducible single step protocol for regeneration of plant using liquid shake culture ; *Terminalia arjuna* (Arjun) and *T. tomentosa* (Asan) by PriyaRanjan *et al.* (1994) to induce callus ; *T. arjuna* (Arjun) by Ramesh *et al.* (2002) to regenerate plantlets; and *T. belerica* (Bahera) by Ramesh *et al.* (2005) to induce somatic embryogenesis.

Under the present investigation, the authors for the first time have studied the rapid induction, proliferation and maintenance of callus of Indian *Shorea robusta* G. by *in vitro* technique for further scope of plant regeneration.

### MATERIALS AND METHODS

Leaf explants of *Shorea robusta* G. after washing with 5% teepol for 10 minutes and rinsed several times in single distilled water, were surface sterilized in 0.1% HgCl<sub>2</sub> solution for about 8 minutes followed by thorough washing with sterile distilled water.

Pieces of about 1 cm<sup>2</sup>. of tender leaf explants were first soaked in liquid medium consisting of macro nutrients of Murashige and Skoog (1962); Gamborg's B5 vitamin (Gamborg *et al.*, 1968) and 3% sucrose fortified with 6-benzyl aminopurine (BAP), Kinetin (Kn), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) of different concentrations (0.1-4 mg/l) and combinations, so as to allow the medium to penetrate into almost all the cells of explants. The pH of the medium was adjusted between 5.6 -5.8 with the help of KOH solution. After 24 hours, the explants were cultured on semi-solid media of the same combinations. All cultures were maintained at 25 ± 2° C temperature exposed to photoperiod of 16/8 hours of light/dark duration (Fluorescent lamp, ca 3000 Lux).

The growth index of callus was calculated on every 21 days of growth. Growth index was calculated as follows:

$$\text{Growth index} = \frac{\text{F. W.} - \text{I. W.}}{\text{I. W.}}$$

F.W. = Final fresh weight      I.W. = Initial fresh weight

### RESULTS AND DISCUSSION

The explants cultured on semi-solid media with different concentrations of growth hormones, first enlarged and then curled. Callusing was observed after about 4-5 weeks of culture. BAP and Kn alone did not provide any remarkable result. The maximum response of callus induction was found in the medium supplemented with 2,4-D (3 mg / l) + Kn (0.1 mg/l) (Table I). Further, callus proliferation was also reported best in the same medium. Addition of kinetin at very low concentration to 2,4-D was found enhancing the growth of callus. Combination of BAP along with Kn did not provide any superiority over the use of 2,4-D + Kn. The callus formed was compact, nodular and creamish-yellow. During proliferation it turned greenish-yellow.

**Table I. Callus response to different growth regulators supplemented media.**

*Tableau I. Réponse du cal dans des milieux supplémentés avec différents régulateurs de croissance.*

Kn (mg/l)	2,4-D (mg/l)				
	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
0.1	+	++	++	+++	++
0.5	+	++	+	+	+
1.0	+	+	++	+	+
2.0	+	++	+	+	+
3.0	+	++	+	++	+
4.0	+	+	+	+	+

+ Minimum    ++ Moderate / *Modérée*    +++ Maximum



Table II. Growth rate of callus in long term culture.

Tableau II. Taux de croissance du cal en culture à long terme.

Days in culture	21	42	63	84	105	126	147	168
<i>Nbre de jours de culture</i>								
Growth index <i>Indice de croissance</i>	0.20	0.50	1.40	2.50	3.85	4.75	5.20	5.45

Ageing has considerable impact upon the callus, as during subsequent cultures callus turned soft, brown in colour. The callus ceased to grow due to accumulation of phenolic compounds which was also reported in other angiosperm taxa (Shah and Mehta, 1976; Singh and Rao, 1982).

The growth index showed slow increase in the beginning and gradually increases with the age of callus, culminating during 3-4 months of sub-culturing and slowing down almost to static after attending about 5-6 months of age (Table II).

In the present study, proliferation and maintenance of callus found responding to different growth hormones in different ways and the medium studied here is found most suitable for the purpose. *In vitro* technique for rapid callusing is possible, which in turn can be exploited for plant regeneration as and when required and for the study of biosynthetic products.

## REFERENCES

- GAMBORG O.L., MILLER R.A. & QJIMA K. (1968). Exp. Cell Res. 50, 151-158.
- JAIN M. & CHATURVEDI S.C. (2002). *In vitro* proliferation of shoot of *Shorea robusta* F. In: Nadi, S.K. Pavli LMS & Kumar A.(Eds), Role of Plant Tissue Culture in Biodiversity Conservation and Economic Development Gyanodya Prakashan, Nainital, India, pp 73-78.
- MURASHIGE T. & SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- PRIYA RANJAN, TIRKEY J, ISA M., PRASAD D.N. & SINHA, S.S.(1994). Callusing behaviour of Arjuna and Asan. Fifth All India Conference of Society of Cytologists and Genetics, Kurushetra, Haryana India. P. 110.
- RAMESH M., PAVAN U., SHYAMPASAD S., RAO A.V. & SADANANDAM A. (2002). *In vitro* regeneration of plants from mature nodal segments of *Terminalia arjuna* B. Sericologia 42(1), 75-80.
- RAMESH M., PAVAN U., VENUGOPAL RAO & SADANANDAM A.( 2005). Micropropagation of *Terminalia belerica* R- A sericulture and medicinal plant. *In vitro* Cellular and Developmental Biology- Plant. 41 (3), 320-323.
- SHAH R.R. & MEHTA A.R. (1976). Growth and phenolic production in callus culture of *Crotolaria*. Curr. Sci. 47, 91-92.
- SINGH B.D., RAO G.S.R.L. & SINGH R.P.(1982). Polyphenol accumulation in callus culture of Cowpea (*Vigna sinensis*). Ind. Jour. Exp. Biol. 20, 387-389.
- TEWARY P.K. & OKA S.(1999). Simplified clonal multiplication of mulberry (*Morus indica*) using liquid shake culture. Plant Cell Tiss. Org. Culture. 59, 223-226.

## INDUCTION ET PROLIFERATION DE CALS DE *SHOREA ROBUSTA* G. (SAL) *IN VITRO*

P. K. TEWARY, M. K. SINGH & N. SURYANARAYANA

Central Tasar Research Institute, Nagri, Ranchi – 835 303, Jharkhand, Inde.

*On démarre et on maintient le cal de Shorea robusta G. à partir d'explants de feuille, d'abord trempés dans un milieu liquide MS additionné de BAP, de Kn et de 2,4-D, puis cultivés par la suite sur un milieu semi-solide de la même composition. Après un certain âge, on observe un brunissement du cal, en raison de l'accumulation phénolique. On constate que la croissance est maximum au bout d'une durée d'environ 4 mois.*

### INTRODUCTION

Depuis quelques temps, on a procédé à de nombreux essais de culture des tissus chez des espèces d'arbres importantes. *Shorea robusta* G. est l'un des arbres importants, sur le plan économique, connu non seulement pour son bois mais aussi pour la culture extensive du tasar. C'est la plante hôte principale du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. Une des écoraces les plus économiques d'*Antheraea mylitta* D., « Raily » se nourrit sur le feuillage de *Shorea robusta*. Les taxa sont disponibles dans le monde entier principalement dans les régions de Madhya Pradesh et de Chatisgarh en Inde. Bien que *Shorea robusta* soit un grand arbre, on le maintient, cependant, à taille humaine pour élever le ver à soie tasar de manière efficace. En dehors de *Shorea robusta*, différentes espèces de *Terminalia*, c'est-à-dire *T. arjuna*, *T. tomentosa*, *T. chebula*, *T. belerica* sont des plantes hôtes de différentes écoraces d'*Antheraea mylitta* D. Il existe plusieurs autres plantes hôtes secondaires et tertiaires de ce ver à soie. Les rapports sur la culture de tissus de *Shorea robusta* G. sont très rares, presque inexistantes. Jain et Chaturvedi (2002) ont procédé à des essais pour induire des plants à partir de la culture de tissus de *Shorea robusta* G., cependant, il n'y a pas eu de suite. Tewary et Oka (1999) ont fait des essais réussis avec d'autres plants d'arbres liés à la sériciculture, c'est à dire avec *Morus alba* (mûrier) pour mettre au point un protocole adapté et reproductible en une étape pour la régénération de plant en utilisant une culture liquide à agiter, PriyaRanjan et coll., (1994) sur *Terminalia arjuna* (Arjun) et *T. tomentosa* (Asan) pour induire un cal, Ramesh et coll., (2002) avec *T. arjuna* pour régénérer des jeunes plants et Ramesh et coll., (2005) avec *T. belerica* (Bahera) pour induire l'embryogenèse somatique.

Dans cette étude, les auteurs ont étudié pour la première fois l'induction, la prolifération et le maintien rapides de cals du *Shorea robusta* G. indien grâce à une technique *in vitro*, pour accroître les possibilités de régénération des plants.

### MATERIELS ET METHODES

Après avoir lavé les explants de feuilles de *Shorea robusta* G. avec 5 % de teepol pendant 10 minutes, et les avoir rincés plusieurs fois dans de l'eau distillée, on stérilise leur surface avec une solution d'HgCl<sub>2</sub> à 0,1 % pendant environ 8 minutes, puis on les lave soigneusement avec de l'eau distillée stérile.

On trempe, d'abord, des morceaux d'explants de feuilles tendres d'environ 1 cm<sup>2</sup> dans un milieu liquide constitué de macronutriments de Murashige et Skoog (1962), de vitamine B5 de Gamborg (Gamborg et coll., 1968) et de 3 % de saccharose fortifié avec de la 6 - benzyle amino purine (BAP), de la kinétine (Kn), de l'acide 2,4 dichlorophenoxy acétique à différentes concentrations (0,1 - 4 mg / l) et combinaisons, de manière à permettre au milieu de pénétrer dans toutes les cellules des explants. On ajuste le pH du milieu entre 5,6 et 5,8 à l'aide d'une solution KOH. Au bout de 24 h, on cultive les explants sur des milieux semi-solides des mêmes combinaisons. On maintient toutes les cultures à une température de 25 ± 2° C et on les expose à une photopériode de 16 / 8 heures de lumière / obscurité (lampe fluorescente, ca 3000 Lux).

On calcule l'indice de croissance du cal tous les 21 jours. On calcule l'indice de croissance comme suit :

$$\text{Indice de croissance} = \frac{\text{F. W.} - \text{I. W.}}{\text{I. W.}}$$

FW = Poids frais final

IW = Poids frais initial

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les explants cultivés sur des milieux semi-solides avec différentes concentrations d'hormones de croissance grandissent d'abord, puis se courbent. On observe une formation de cals au bout d'environ 4 à 5 semaines de culture. Le BAP et le Kn seuls ne donnent pas de résultats remarquables. On observe la réponse maximum d'induction de cal avec le milieu additionné avec du 2,4-D (3 mg / l) + Kn (0,1 mg / l) (Tableau I). De plus, on a aussi rapporté que la prolifération est la meilleure dans ce même milieu. On constate que l'ajout de kinétine à une très faible concentration au 2,4- D améliore la croissance du cal. La combinaison de BAP avec du Kn n'est pas supérieure par rapport à l'utilisation de 2,4-D + Kn. Le cal qui se forme est compact, nodulaire et jaune crème. Pendant sa prolifération, il devient jaune vert.

Le vieillissement a un impact considérable sur le cal, puisque pendant les cultures ultérieures, le cal devient mou, et de couleur marron. Le cal cesse de croître à cause de l'accumulation de composés phénoliques, ce que l'on a aussi rapporté chez d'autres taxa angiospermes (Shah et Mehta, 1976 ; Singh et Rao, 1982).

L'indice de croissance présente une augmentation lente au début puis une augmentation progressive avec l'âge du cal, qui culmine au bout de 3-4 mois de sous-culture et baisse presque à l'état statique, après avoir atteint environ 5 à 6 mois d'âge (Tableau II).

Dans cette étude, on constate que les différentes hormones de croissance entraînent différentes réponses de prolifération et de maintien du cal et le milieu étudié ici s'avère adapté dans le but recherché. Il est possible d'avoir recours à une technique *in vitro* pour la formation rapide de cal et on peut l'exploiter, à son tour, pour la régénération de plants selon les besoins et pour l'étude de produits biosynthétiques.



## 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](mailto: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.

## 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 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 premières 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.

