

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Influencia de tres variedades de *Morus alba* L. en el crecimiento de *Bombyx mori* L.

Influence of three Morus alba L. varieties on the growth of Bombyx mori L.

Marlene Prieto-Abreu¹, Maykelis Díaz-Solares¹, María del Carmen Pérez-Hernández²,
Dayron Martín-Prieto³

¹ Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey,
Universidad de Matanzas, Ministerio de Educación Superior
Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba

² Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

³ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

Correo electrónico: marlene.prieto@ihatuey.cu

RESUMEN: Se estudiaron tres variedades de *Morus alba* (tigreada, universidad y yu-62) con el objetivo de determinar su composición proximal y su incidencia en el crecimiento de las larvas de *Bombyx mori*, polihíbrido Chul Tai-6. Para el análisis y la alimentación se utilizaron hojas maduras, y se determinó la materia seca (MS), la humedad, la fibra bruta (FB), la proteína bruta (PB), el calcio (Ca), el fósforo (P), el potasio (K) y la ceniza. El diseño fue completamente aleatorizado (tres réplicas de 100 gusanos por variedad). Se midió el peso de la larva el primer y el quinto días de la quinta edad, y el crecimiento promedio de un gusano por día. Los porcentajes de humedad y de PB resultaron mayores para la var. yu-62 (75,9 % y 20,10 %, respectivamente); no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de FB. La var. tigreada presentó valores significativamente altos de ceniza. Las larvas alimentadas con yu-62 mostraron la mayor tasa de crecimiento relativo -TCr- (638,95^a ± 114,2), mientras que la menor TCr se obtuvo con tigreada (466,59^c ± 87,97). Se concluye que la variedad yu-62 presentó los mejores indicadores bromatológicos y una mayor TCr, por lo que se recomienda para ser utilizada en la sericultura en Cuba.

Palabras clave: gusano de seda, hojas, minerales.

ABSTRACT: Three *Morus alba* varieties (tigreada, universidad and yu-62) were studied in order to determine their proximal composition and their incidence on the growth of *Bombyx mori* larvae, polyhybrid Chul Tai-6. For the analysis and feeding mature leaves were used, and the dry matter, moisture, crude fiber (CF), calcium (Ca), phosphorus (P), potassium (K) and ash were determined. The design was completely randomized (three replications of 100 silkworms per variety). The weight of the larva on the first and fifth days of the fifth instar and the average growth of a worm per day were measured. The moisture and CP percentages were higher for var. yu-62 (75,9 and 20,10 %, respectively); there were no significant differences among the CF percentages. Var. tigreada showed significantly high values of ash. The larvae fed yu-62 showed the highest relative growth rate -RGR- (638,95^a ± 114,2), while the lowest RGR was obtained with tigreada (466,59^c ± 87,97). It is concluded that variety yu-62 showed the best bromatological indicators and a higher RGR, for which it is recommended to be used in Cuban sericulture.

Keywords: silkworm, leaves, minerals

INTRODUCCIÓN

Las hojas de morera (*Morus* sp.) constituyen la fuente de alimento tradicional y casi exclusiva del gusano de seda (*Bombyx mori* L.), de las cuales obtienen los nutrientes y el agua necesarios para crecer y desarrollarse. El crecimiento de las larvas está estrechamente relacionado con la calidad

nutricional de la variedad de morera (Cifuentes y Sohn, 1998).

Los gusanos de seda prefieren las hojas con mayor contenido de PB y de humedad. Los minerales también desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de este lepidóptero (Pescio *et al.*, 2008). La falta de Ca influye en la palatabilidad;

y en cuanto al K, aunque todavía no están bien definidas sus funciones, influye en el equilibrio iónico de la hemolinfa y mejora el contenido de la corteza de seda del capullo, por lo que se requiere del aporte continuo de estos elementos químicos (Cifuentes y Sohn, 1998).

Los contenidos de proteína, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerales y agua, en las hojas de morera, dependen de la variedad, la fertilidad del suelo, el clima, la época del año, la edad y la posición de las hojas. Se recomienda alimentar las larvas adultas (cuarta y quinta edad) con ramas de morera en crecimiento vegetativo, entre 75 y 100 días, etapa durante la cual consumen más del 90 % del alimento ingerido en la etapa de crianza (Porto y Okamoto, 2013).

Se han realizado investigaciones sobre la respuesta varietal y los aspectos relacionados con la composición bioquímica de las hojas de morera (Jyothi *et al.*, 2014), en las que se ha discutido la importancia de la calidad de estas para la alimentación del gusano de seda. Al respecto, Pescio *et al.* (2008) señalaron que las hojas le deben «gustar» a los gusanos, por lo que este es uno de los primeros requisitos que se tienen en cuenta para alimentar a *B. mori*. Aunque todas las hojas son consumidas, es frecuente que las de una variedad sean preferidas con respecto a las de otra.

El objetivo del estudio fue determinar la composición proximal y de minerales de las hojas de tres variedades de *Morus alba* (tigreada, universidad y yu-62), así como evaluar su efecto en el crecimiento de las larvas del gusano de seda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clima y suelo. Las variedades de *M. alba* (tigreada, universidad y yu-62) se cultivaron en febrero de 2014, en el área experimental Norte, campo No. 4, en la provincia de La Habana. Los suelos están clasificados como Ferralíticos Rojos, con un contenido adecuado de materia orgánica (3,39 %), y se fertilizan tres veces al año con dosis de 300-120-300 kg de N-P-K/ha/año (Instituto de Suelos, 2013).

Procedimiento experimental. Las plantas utilizadas tenían dos años de establecidas, en un marco de siembra de 1,0 x 0,5 m (2 000 plantas/ha); la frecuencia de poda fue de 90 días, a una altura de corte de 0,5 m; el área neta contó con 200 plantas y se muestreó el 10 %. La biomasa en las tres variedades, al momento del estudio, fue superior a los 300 g de hojas frescas por planta; las hojas se seleccionaron teniendo en cuenta su tamaño, textura, color y sanidad.

Análisis proximal y de minerales. Se colectaron tres muestras al azar de las hojas maduras y frescas de las diferentes variedades, a razón de 100 g de cada una. Las hojas de morera fresca se pesaron y se deshidrataron en una estufa de ventilación forzada –modelo Memmert–, a 60-80 °C, para determinar la MS y la humedad. Se estimaron los indicadores fibra bruta (FB), proteína bruta (PB), calcio (Ca), fósforo (P), potasio (K) y ceniza, por las normas de la AOAC (1995).

Crianza de larvas de gusano de seda. La crianza del gusano de seda se realizó en los meses de enero y febrero de 2014. Se utilizó el polihíbrido Chul Thai-6, que ya había sido evaluado durante dos años en Cuba. La sala de cría y los utensilios fueron desinfectados previamente con agentes bactericidas y fungicidas. Los pisos de las camas se vistieron con papel Kraft y se cambiaron al finalizar cada edad de la fase larval. Durante la crianza se mantuvieron las condiciones ambientales controladas: 23 ± 2 °C, 72 ± 3 % de humedad relativa, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

Muestreo y evaluación. Se establecieron unidades de crianza de 100 gusanos, en un diseño experimental completamente aleatorizado, con tres réplicas por cada variedad de morera. El suministro de alimento a las larvas comenzó a partir de la tercera edad. Se llevó a cabo un régimen de alimentación de tres comidas por día (8:00 a. m., 1:00 p. m. y 7:00 p. m.) con hojas frescas y maduras. En los días de muda, que marcaron el fin de cada etapa durante la fase larval, no se les proporcionó alimento.

Peso de la larva. Se midió el peso individual de las larvas en las tres réplicas utilizadas por cada variedad, el primer y el quinto día de la quinta edad, de acuerdo con los estudios de Meneguim *et al.* (2007) y Munhoz *et al.* (2009).

Determinación de la tasa de crecimiento (TCr). Se determinó el crecimiento promedio de un gusano en un día (mg/gusano/día), teniendo en cuenta la ecuación propuesta por Meneguim *et al.* (2010).

$$TCr = \frac{G}{T}$$

G: ganancia de peso de las larvas entre el primer y quinto día de la quinta edad (mg).

T: duración del periodo de alimentación (días).

Análisis estadístico. Se realizó la comparación de los valores promedio de las diferentes variables mediante un ANOVA simple y se aplicó la prueba

de Tukey, con 0,05 % de significación. Se usó el paquete estadístico GraphPad Prism 5.01. El procesamiento estadístico se realizó según lo reportado por diferentes autores que trabajan la temática de sericultura (Meneguim *et al.*, 2007; Munhoz *et al.*, 2009; Rodríguez-Ortega *et al.*, 2012; Rodríguez-Ortega *et al.*, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de materia seca y humedad. El valor más alto de MS de las hojas (31 %) se presentó en la var. tigreada, que difirió significativamente en relación con las vars. universidad y yu-62 (tabla 1).

González *et al.* (2011) reportaron un 28,13 % de MS para la var. tigreada en condiciones de cultivo similares a las del presente estudio, pero en una región diferente del país. Tales diferencias pudieran ser consecuencia de la interacción genotipo-ambiente, debido al empleo de diferentes tipos de suelos y a la variación de su contenido de materia orgánica.

La humedad en las hojas de la var. yu-62 fue superior y difirió significativamente del resto. En este sentido, Porto (2000) refirió que las larvas en la quinta edad mostraron mejor desempeño cuando se alimentaron con hojas que contenían entre 75 y 90 % de humedad, y que cuando el porcentaje de agua fue insuficiente, el gusano de seda no aprovechaba de forma adecuada el alimento porque presentaba afectaciones directas en el proceso digestivo.

De acuerdo con los porcentajes de MS y de humedad que presentaron las variedades, los cuales

coinciden con el recomendado por Porto y Okamoto (2013), estas pueden calificarse como adecuadas para alimentar a las larvas en la quinta edad.

Conocer el contenido de PB es importante, ya que las proteínas y sus aminoácidos desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo del gusano de seda (Porto, 2002). En la tabla 2 se muestra el porcentaje de PB en la MS de las hojas de las variedades en estudio. El mayor valor de PB se encontró en la var. yu-62, seguida por universidad y tigreada.

El manejo del cultivo de la morera influye de manera marcada en el contenido de PB de las hojas. La fertilización química u orgánica (Benavides, 2002), la época del año (González y Cáceres, 2002), la altura de corte (Martín *et al.*, 2002), la densidad de plantación (Boschini *et al.*, 1998) y la variedad (Huo, 2002) son algunos de los aspectos del manejo agronómico que inciden en este indicador.

Estudios realizados por Singh y Makkar (2002) demostraron que en la India, para alimentar a las larvas del gusano de seda, las hojas de morera deben tener entre 15,0 y 27,6 % de PB; a partir de este criterio se estimó que los valores de PB de la presente investigación son adecuados.

El mayor porcentaje de FB (19,25 %) se encontró en la var. universidad, que no difirió del resto (tabla 2). Aunque no hubo diferencias significativas entre el porcentaje de FB de las variedades, es importante señalar que el contenido de FB en las hojas de yu-62 se encuentra en el límite superior del rango propuesto por Singh y Makkar (2002). Estos

Tabla 1. Materia seca y humedad en las hojas de morera

Variedad	MS (%)	Humedad (%)
Tigreada	31,00 ^a ± 0,30	69,00 ^c ± 0,30
Universidad	27,50 ^b ± 1,30	72,50 ^b ± 1,30
Yu-62	24,10 ^c ± 1,00	75,90 ^a ± 1,00

a, b, c: valores con diferentes superíndices en cada fila difieren a $p \leq 0,05$ (prueba de Tukey). Se presenta el valor promedio con la desviación estándar, a partir de tres muestras de hojas tomadas aleatoriamente.

Tabla 2. Proteína bruta y fibra bruta en la MS de las hojas de morera

Variedad	PB (%)	FB (%)
Tigreada	17,85 ^c ± 0,01	17,78 ^a ± 2,27
Universidad	18,29 ^b ± 0,03	19,25 ^a ± 1,36
Yu-62	20,10 ^a ± 0,03	15,33 ^a ± 1,30

a, b, c: valores con diferentes superíndices en cada fila difieren a $p \leq 0,05$ (prueba de Tukey). Se presenta el valor promedio con la desviación estándar.

autores recomiendan valores entre 9,1 y 15,3 % de FB para alimentar a los gusanos de seda en la India. Sin embargo, las hojas de las vars. tigreada y universidad no cumplieron con este criterio, ya que lo sobrepasaron.

El contenido de FB tiene influencia directa en la digestibilidad; en este sentido, con el aumento de la fibra hay una menor digestibilidad del alimento, unido a un menor consumo. Los componentes químicos presentes en la FB dificultan la digestibilidad de las proteínas y su biodisponibilidad (Meneguim *et al.*, 2010).

En cuanto a los minerales, tigreada presentó valores altos de ceniza, P y Ca. En estos tres indicadores superó de forma significativa a universidad y yu-62, pero mostró menor porcentaje de K (tabla 3).

El contenido de ceniza en las vars. tigreada y universidad fue superior al reportado por Martín *et al.* (2002), mientras que la yu-62 presentó el porcentaje más bajo. Meneguim *et al.* (2010), al evaluar siete cultivares de *M. alba* en Brasil, hallaron que la ceniza varió entre 11,6 y 12,0 %; mientras que Rodríguez-Ortega *et al.* (2013) obtuvieron valores superiores (16,2 %) a los de esta investigación.

Singh y Makkar (2002) sugirieron que los porcentajes óptimos para alimentar al gusano de seda están entre 0,23-0,97 para el P y 1,66-3,25 para el K. En este sentido, los tenores de P en las vars. yu-

62 y universidad presentaron valores favorables para el desarrollo de la larva; sin embargo, tigreada tuvo un valor significativamente alto (1,64 %), y según Cifuentes y Sohn (1998) un elevado contenido de P provoca el endurecimiento de las hojas y la disminución de la palatabilidad.

En relación con el contenido de K, las tres variedades mostraron valores superiores a los estándares sugeridos. Universidad presentó el mayor porcentaje y difirió del resto.

Los minerales desempeñan diferentes funciones asociadas al metabolismo celular en el gusano de seda. Los insectos necesitan cantidades considerables de distintos minerales (potasio, fósforo, magnesio, calcio, sodio y cloro), y la importancia de estos radica en que son los protagonistas en el balance iónico y en la permeabilidad de la membrana celular, además de actuar como activadores de las enzimas y formar parte de pigmentos respiratorios (Porto, 2002).

En cuanto al crecimiento del gusano al quinto día de la quinta edad, las larvas alimentadas con la var. yu-62 mostraron el mayor peso promedio, seguidas por aquellas que recibieron las hojas de universidad y tigreada (figs. 1 y 2).

El crecimiento de las larvas del gusano de seda está estrechamente relacionado con la calidad nu-

Tabla 3. Contenido de ceniza, P, K y Ca en hojas de *M. alba* (%)

Variedad	Ceniza (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)
Tigreada	14,40 ^a ±0,20	1,64 ^a ±0,04	3,92 ^c ±0,10	2,65 ^a ±0,10
Universidad	13,10 ^b ±0,30	0,66 ^b ±0,01	4,44 ^a ±0,10	2,24 ^b ±0,10
Yu-62	10,00 ^c ±0,20	0,58 ^c ±0,01	4,18 ^b ±0,10	2,17 ^c ±0,10

a, b, c: valores con diferentes superíndices en cada fila difieren a $p \leq 0,05$ (Prueba de Tukey). Se presenta el valor promedio con la desviación estándar.



Figura 1. Larvas de gusano de seda en la quinta edad.

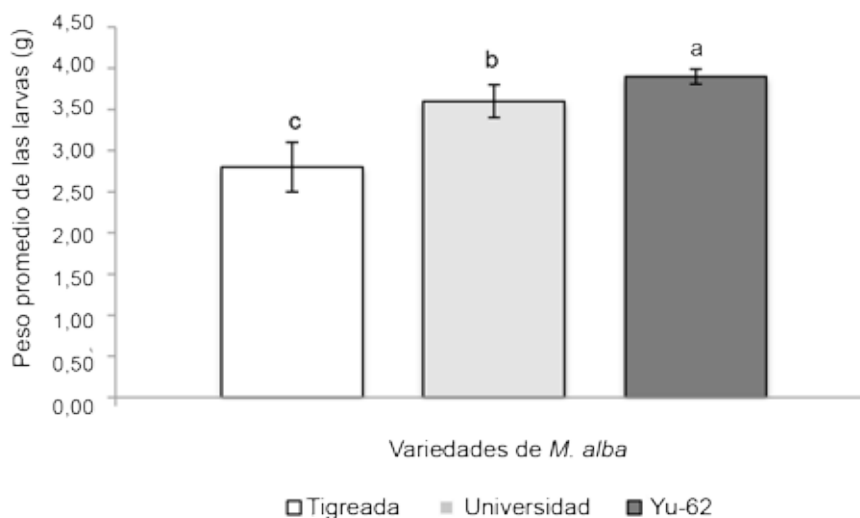


Figura 2. Peso promedio de las larvas de *B. mori* al quinto día de la quinta edad. (Los superíndices a, b y c difieren estadísticamente según la prueba de Tukey, $p \leq 0,05$).

tricional de la variedad de *M. alba* que consumen (Porto, 2002; Meneguim *et al.*, 2007).

Generalmente, las larvas de *B. mori* con alto peso corporal tienen glándulas de seda más desarrolladas. Esta glándula crece de manera acelerada en la quinta edad y ocupa hasta el 40 % del cuerpo del insecto, por lo que la cantidad y la calidad de la morera que consuma en esta fase resultan de gran importancia para la producción de capullos (Cifuentes y Sohn, 1998).

Las larvas alimentadas con yu-62 mostraron una TCr diaria mayor que las que ingirieron las vars. universidad y tigreada (tabla 4).

Tabla 4. Tasa de crecimiento de las larvas de *B. mori* (mg/gusano/día).

Variación	TCr
Tigreada	466,59 ^c ± 87,97
Universidad	586,38 ^b ± 144,30
Yu-62	638,95 ^a ± 114,20

a,b,c: valores con diferentes superíndices difieren a $p \leq 0,05$ (prueba de Tukey). Se presenta el valor promedio con la desviación estándar entre tres réplicas.

El crecimiento de *B. mori* varía de acuerdo con la raza, la época de crianza, la temperatura y la calidad de la morera (Meneguim *et al.*, 2010). Aproximadamente el 80-90 % del peso total del cuerpo del gusano está formado por agua, pero durante la quinta edad se activa su eliminación a medida que se acerca el

encapulado, hasta representar el 75 % del peso vivo (Cifuentes y Sohn, 1998).

Las biomoléculas que más se acumulan en el gusano de seda son las grasas y el glucógeno, las que alcanzan hasta 33 y 50 % del peso seco total de las larvas, respectivamente (Cifuentes y Sohn, 1998). A pesar de que las proteínas se acumulan menos que los carbohidratos y los lípidos en el cuerpo del gusano, son mucho más determinantes para el crecimiento y desarrollo de estos insectos, ya que regulan el crecimiento celular a partir de sus funciones como enzimas, canales iónicos y elementos estructurales celulares.

La proteína es considerada como el nutriente más requerido por los insectos fitófagos, y generalmente, la mayor limitante para un óptimo crecimiento. En el presente estudio la mayor calidad nutricional la presentó la var. yu-62. También es preciso destacar que yu-62 se comportó en correspondencia con lo planteado por otros autores (Porto, 2002; Meneguim *et al.*, 2007; Munhoz *et al.*, 2009; Kalaivani *et al.*, 2013) sobre la correlación positiva que se logra al alimentar las larvas con hojas de morera que presentan mayor porcentaje de PB y humedad, menor porcentaje de FB y mejor balance entre los minerales.

Se concluye que existió una relación entre la calidad nutricional de las hojas de morera y el crecimiento de las larvas. La var. yu-62 presentó los mejores caracteres bromatológicos y la mayor TCr, por lo que se recomienda para ser utilizada en la sericultura en Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. *Official Methods of Analysis*. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- Benavides, J. E. Utilization of mulberry in animal production systems. In: M. D. Sánchez, ed. *Mulberry for animal production*. FAO Animal Production and Health Paper No. 147. Rome: FAO. p. 291-327, 2002.
- Boschini, C.; Dormond, H. & Castro, A. Producción de biomasa de la morera (*Morus alba*) en la meseta central de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 9 (2):31-40, 1998.
- Cifuentes, C. & Sohn, K. W. *Manual técnico de sericultura: cultivo de la morera y cría del gusano de seda en el trópico*. Pereira, Colombia: Convenio SENA-CDTS, 1998.
- González, E. & Cáceres, O. Valor nutritivo de árboles, arbustos y otras plantas forrajeras para los rumiantes. *Pastos y Forrajes*. 25 (1):15-20, 2002.
- González, E.; Martín, G. J.; Albanell, Elena; Caja, G. & Rosas, N. Composición nutritiva del forraje de morera (*Morus alba* var. tigreada) ante diferentes frecuencias de corte y niveles de fertilización. I. Contenido celular. En: Milagros Milera, comp. *Morera: un nuevo forraje para la alimentación del ganado*. Matanzas, Cuba: EEPF Indio Hatuey. p. 119-123, 2011.
- Huo, Y. Mulberry cultivation and utilization in China. In: M. D. Sánchez, ed. *Mulberry for animal production*. FAO Animal Production and Health Paper No. 147. Rome: FAO. p. 11-43, 2002.
- Instituto de Suelos. *Estudio agroquímico de los suelos y programa de fertilización de la morera en la granja Futuro Lechero*. La Habana: Instituto de Suelos, 2013.
- Jyothi, M. M.; Pratap, T. N. & Thimma, S. Studies on biochemical constituents of different genotypes of *Morus alba*. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 5 (2):835-840, 2014.
- Kalaivani, M.; Jebanesan, A.; Maragathavalli, S.; Annadurai, B. & Gangwar, S. K. *Studies on chlorophyll content, soluble protein, carbohydrates and moisture content of Morus alba Linn*. Ethiopia: Department of Agriculture, Rangeland and Wildlife Sciences, College of Agriculture, Mekelle University, 2013.
- Martín, G. J.; Reyes, F.; Hernández, I. & Milera, Milagros. Agronomic studies with mulberry in Cuba In: M. D. Sánchez, ed. *Mulberry for animal production*. FAO Animal Production and Health Paper No. 147. Rome: FAO. p. 103-113, 2002.
- Meneguim, Ana M.; Lovato, Lidiana; Silva, Roberta Z. da; Yamaoka, R. S.; Nagashima, G. T. & Pasini, A. Influence of mulberry cultivars *Morus* spp. on the production and quality of silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) cocoons. *Neotropical Entomology*. 36 (5):670-674, 2007.
- Meneguim, Ana M.; Lustrí, Crisitna; Oliveira, Dássia D. de; Yada, Inés F. U. & Pasini, A. Caracterização bromatológica de cultivares de amoreira, *Morus* spp., e determinação dos índices nutricionais de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Neotropical Entomology*. 39 (4):506-512, 2010.
- Munhoz, Roxelle E. F.; Mendes, T. de A.; Reginato, E. T.; Neto, G. G.; Davies, T. R.; Bravo, Juliana P. et al. A influência de cultivares de amoreiras adubadas sobre características biológicas e produtivas do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* 12 (2):129-133, 2009.
- Pescio, F.; Zunini, H.; Basso, C. P.; Divo de Sesar, Marta; Frank, R. G.; Pelicano, Alicia E. et al. *Sericultura. Manual para la producción*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Universidad de Buenos Aires, 2008.
- Porto, A. J. Aspectos nutricionais do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Boletim Indústria Animal*. 59 (1):79-99, 2002.
- Porto, A. J. *Efeito da idade de corte de dois cultivares de amoreira no desempenho e características do casulo do bicho-da-seda*. Dissertação de mestrado. Botucatu, Brasil: UNESP, Faculdade de Medicina e Zootecnia, 2000.
- Porto, A. J. & Okamoto, Fumiko. Sistemas de utilização de dois cultivares de amoreira em duas idades de crescimento vegetativo, no desempenho do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Boletim Indústria Animal*. 57 (2):171-178, 2013.
- Rodríguez-Ortega, A.; Martínez-Menchaca, A.; Ventura-Maza, A. & Vargas-Monter, J. Adaptación de tres variedades de morera (*Morus* spp.) en el estado de Hidalgo. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 3 (4): 671-683, 2012.
- Rodríguez-Ortega, A.; Martínez-Menchaca, A.; Ventura-Maza, A.; Vargas-Monter, J.; Ehsan, M. & Lara-Viveros, F. M. Evaluación de variedades de morera en la alimentación del gusano de seda (*Bombyx mori*) en Hidalgo, México. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 4 (5):701-712, 2013.
- Singh, B. & Makkar, H. P. S. The potential of mulberry foliage as a feed supplement in India. In: M. D. Sánchez, ed. *Mulberry for animal production*. FAO Animal Production and Health Paper No. 147. Rome: FAO. p. 139-155, 2002.