

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

BEAULATON J. (France)
BECK D. (France)
BOSQUET G. (France)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / India)
DATTA R.K. (Inde / India)
DOIRA H. (Japon / Japan)
FONSECA T.C. (Brésil / Brazil)
FOURCHE J. (France)
FREDDI G. (Italie / Italy)
GOLDSMITH M.R. (USA)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / India)
KAWAKAMI K. (Japon / Japan)
KOBAYASHI M. (Japon / Japan)
KRISHNASWAMY S. (Inde / India)

LEGAY J-M. (France)
LIU S-X. (Chine / China)
LU H-S. (Chine / China)
MANO Y. (Japon / Japan)
NARASIMHANNA M.N. (Inde / India)
PERSOONS C.J. (Pays-Bas / Netherlands)
PRUDHOMME J-C. (France)
REALI G. (Italie / Italy)
SHIMURA K. (Japon / Japan)
SHIRATA A. (Japon / Japan)
SONWALKAR T.N. (Inde / India)
TAKAHASHI R. (Brésil / Brazil)
TAZIMA Y. (Japon / Japan)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J-G. (Chine / China)
YAMASHITA O. (Japon / Japan)

SOMMAIRE - CONTENTS

Informations CSI / ISC announcements i-ii

Articles originaux / Original papers :

The heat-shock response and heat sensitivity of *Bombyx mori* 533
 Réaction au choc thermique et sensibilité à la chaleur de *Bombyx mori* 539
 C.M.F. LOHMANN & L.M. RIDDIFORD

Genetic path network among quantitative characters in *Bombyx mori* L. 543
 Relations génétiques entre les caractères quantitatifs chez *Bombyx mori* L. 549
 LI W.

Effect of N-nitroso-N-ethylurea on the induction of dominant lethals in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) 551
 Effet du N-nitroso-N-éthylurée sur l'induction de mutations létales chez le ver à soie *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) 557
 M. ABDUS SALAM, M. SAIFUL ISLAM, S. MAHFUZAR RAHMAN & M. NAZMUL HAQUE

Sensilla styloconica on the maxillary lobe of *Bombyx mori* and *Spodoptera litura* . . . 559
 Sensilles styloconiques du lobe maxillaire de *Bombyx mori* et *Spodoptera litura* 565
 T. HIRAO, N. ARAI, T. SHIMIZU & M. YAZAWA

Studies on the effect of ascorbic acid (vitamin C) on the fecundity in the mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) 567
 Etudes sur l'effet de l'acide ascorbique (vitamine C) sur la fécondité chez le ver à soie du mûrier (*Bombyx mori* L.) 575
 T.P.S. CHAUHAN & KAMALA SINGH

Studies on the preservation of seed cocoons of the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., during diapause 579
 Etudes sur la conservation pendant la diapause des cocons du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* D., destinés au grainage 593
 M.L. KAPILA, A. CHAUDHURI, O.P. DUBEY, C.C. CHAUDHURY & S.S. SINHA

Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype H₁₄ on *Antheraea mylitta* D. and *Bombyx mori* L. 597
 Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype H₁₄ chez *Antheraea mylitta* D. et *Bombyx mori* L. 605
 U.P. GRIYAGHEY & K. SENGUPTA

Evaluation of techniques for screening for drought resistance in mulberry 609
 Evaluation de techniques pour sélectionner la résistance à la sécheresse chez le mûrier . . 615
 B.N. SUSHEELAMMA, J.S. KUMAR, T. MOGILI, K. SENGUPTA, M.N. PADMA & N. SURYANARAYANA

Statistical analysis of adaptability of drought resistant mulberry genotypes	619
Analyse statistique de l'adaptabilité de certains génotypes de mûrier résistants à la sécheresse	629
B.N. SUSHEELAMMA, M.S. JOLLY, K. SENGUPTA, K. GIRIDHAR, S. BAKSH, T. MOGILI, R.S. MALLIKARJUNA & T. PAVAN KUMAR	
Aromatic amino acids in the leaves of <i>Morus alba</i> and their possible medicinal value .	633
Les acides aminés aromatiques dans les feuilles de <i>Morus alba</i> et leur valeur médicinale .	637
T. SHIMIZU, M. YAZAWA & N. TAKEDA	
Histopathological and histochemical changes in mulberry (<i>Morus alba</i> L.) leaves due to infection by <i>Aecidium mori</i> (Barcl.) Syd. et Butler	641
Modifications histopathologiques et histochimiques chez le mûrier (<i>Morus alba</i> L.) dues à l'infestation par <i>Aecidium mori</i> (Barcl.) Syd. et Butler	647
G.C. VIJAYAKUMAR	
Protoplast isolation, purification and culture in mulberry (<i>Morus</i> spp.)	651
Isolement, purification et culture des protoplastes chez le mûrier (<i>Morus</i> spp.)	659
P.K. TEWARY & G. LAKSHMISITA	
Wet reeling of daba cocoons with an improved charakha	663
Dévidage humide des cocons daba sur une charkha perfectionnée	667
S. DAS & S.K. CHOWDHURY	
Genetic variability of amylase activity in the mulberry silkworm, <i>Bombyx mori</i> L., and its significance	671
Variabilité génétique de l'activité amylase chez le ver à soie du mûrier <i>Bombyx mori</i> L. et sa signification	685
S.N. CHATTERJEE, C.G.P. RAO, G.K. CHATTERJEE & S.K. ASWATH	
Bibliographie / Bibliography	691

INFORMATIONS CSI

Nous vous avons fait savoir que le **XVI^e Congrès et la XI^e Conférence** de la Commission séricicole internationale devaient se réunir au Caire (Egypte) en 1993.

Le Gouvernement égyptien nous a informé que l'organisation de cette réunion n'était plus possible comme initialement prévu.

La recherche d'autres possibilités pour l'organisation de notre Congrès dans d'autres Etats membres de la CSI ayant été infructueuse, compte tenu du délai très court qu'il restait pour prendre les décisions et gérer l'organisation, nous devons abandonner l'organisation du **XVI^e Congrès** cette année.

Pour la Conférence, qui doit se réunir impérativement en 1993 selon les statuts de la CSI, nous sommes à la recherche d'un lieu. La Conférence ne réunira que les délégués officiels des Etats membres et ne sera pas consacrée aux aspects techniques, scientifiques et économiques comme doit l'être le Congrès qui réunit habituellement 150 à 200 personnes.

Compte tenu de cette situation, nous proposerons au prochain Comité exécutif de la CSI que le Congrès soit, pour une fois, découplé de la Conférence et qu'il puisse se tenir plus tard.

Dans ce cas, le secrétariat de la CSI serait très heureux de recevoir les candidatures pour l'organisation de notre **XVI^e Congrès** en 1994.

Le prochain Comité exécutif de la CSI aura lieu le 2 juin 1993 au siège de la CSI à Lyon-La Mulatière (France). A l'ordre du jour :

1. XI^e Conférence en 1993.
2. XVI^e Congrès en 1994.
3. Prix Louis Pasteur.
4. Comité de classification des cocons.
5. Liste des experts de la CSI.
6. Correspondants de Sericologia dans les différents Etats membres. Rubrique "Actualités".
7. Budget prévisionnel 1993.
8. Examen des candidatures des nouveaux Membres associés.
9. Réunions, ateliers, symposiums dans les différentes sections. Propositions des présidents de section.
10. Questions diverses.

ISC ANNOUNCEMENTS

We had announced that the **XVIth Congress and XIVth Conference** of the International Sericultural Commission would convene in Cairo (Egypt) in 1993.

The Egyptian Government has informed us that the holding of this event was no longer possible, as had been initially scheduled.

As our attempts to find an alternative solution for the holding of our Congress in one of the other ISC Member States proved fruitless, owing to the very short time left for making decisions and managing the organisation, we have to abandon the holding of the XVIth Congress this year.

As for the Conference, which should imperatively be held in 1993 in accordance with the ISC's statutes, we are looking for a venue. The Conference will be reserved for Member States' official delegates and will not be devoted to the technical, scientific and economic aspects as does the Congress which normally brings together 150 to 200 persons.

Given this situation, we will propose to the next ISC Executive Committee that the Congress be exceptionally decoupled from the Conference and that it be held at a later date.

In this case, the ISC secretariat will gladly receive the applications for organising our XVIth Congress in 1994.

The next ISC Executive Committee will be held on 2nd June 1993 at the seat of the ISC in Lyon-La Mulatière (France). On the agenda :

1. XIVth Conference in 1993.
2. XVIth Congress in 1994.
3. Louis Pasteur Prize.
4. Cocoon classification committee.
5. ISC list of experts.
6. Correspondents of Sericologia in the various Member States. Section 'News'.
7. Estimated budget for 1993.
8. Examination of the new Associate Members' applications.
9. Meetings, workshops and symposia in the various sections. Proposals from the section chairpersons.
10. Any other business.

THE HEAT-SHOCK RESPONSE AND HEAT SENSITIVITY OF *BOMBYX MORI*

C.M.F. LOHMANN* & L.M. RIDDIFORD

Department of Zoology, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA.

When exposed to high temperature, numerous organisms undergo a heat-shock response involving new synthesis of heat-shock proteins. We have determined that the heat-shock response of Bombyx mori is similar to that of other insects in that three groups of heat-shock proteins are produced. The heat-shock response of Bombyx mori differs from that of Drosophila in that repression of non-heat-shock protein synthesis is not a prominent feature of the response. In this respect, the Bombyx heat-shock response is similar to that of Manduca. This difference in non-heat-shock protein synthesis may reflect either phylogenetic differences among insect orders or the relatively higher temperatures of which both genera are tolerant.

Keywords : Heat shock, *Bombyx mori*, Lepidoptera.

INTRODUCTION

When subjected to high temperatures, the cells of diverse organisms display a heat-shock response typified by the synthesis of heat-shock proteins. In the most well-studied insect heat-shock response, that of *Drosophila melanogaster*, heat-shock protein synthesis is accompanied by repression of the synthesis of normal proteins (Lindquist, 1980). This heat-shock response is apparently necessary for cellular (Deshaies *et al.*, 1988 ; Chirico *et al.*, 1988) and therefore organismal survival of high temperature.

Details of the heat-shock response differ considerably among different insects. The sizes and numbers of heat-shock proteins can vary from species to species as can the control of normal, non-heat-shock protein synthesis during heat-shock. Some of this variation may reflect either the phylogeny or the heat tolerance of the species. For example, repression of non-heat-shock protein synthesis during heat-shock has been described primarily in the Diptera (Carvalho and Rebello, 1987 ; Bultmann, 1986 ; Stephanou *et al.*, 1983 ; Stephanou, 1982 ; Lindquist, 1980 ; Vincent and Tanguay, 1979) and in one lepidopteran (Yocum *et al.*, 1991) but was not observed in *Manduca* (Fittinghoff and Riddiford, 1990) or *Locusta migratoria* (Whyard *et al.*, 1986), both of which are insects tolerant of very high temperatures.

This paper reports that, in *Bombyx* as in other insects, heat-shock proteins of at least 3 families (as identified by molecular weight) are synthesized in response to high temperature. In *Bombyx* as in *Manduca*, non-heat-shock protein synthesis is not substantially repressed at high temperatures. The maximum tolerable temperature for *Bombyx* larvae is the same (42 °C) as for *Manduca* larvae. The results are consistent with the hypothesis that the continuing synthesis of non-heat-shock proteins during heat-shock may be associated with insects that tolerate high temperatures.

* Present address : Department of Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA.

MATERIALS AND METHODS

Determination of larval heat sensity :

Fifth-instar *Bombyx mori* larvae (Mysore strain) provided by Dr Marian Goldsmith of the University of Rhode Island were maintained on a 16L:8D light cycle at 27 °C and fed a diet of mulberry leaves. Animals that had reached at least 1 g were used for heat sensitivity experiments. The larvae were placed into individual preheated Petri dishes containing a moist Kimwipe. The dishes were then incubated for 1 h at the desired temperature. After 1 h, the animals were transferred back to 27 °C. Those animals that were able successfully to spin cocoons were considered survivors.

Analysis of protein synthesis during heat-shock :

Dorsal abdominal integument was dissected in sterile Grace's medium (Gibco) from 5th-instar male larvae weighing at least 1 g. All fat body and as much muscle as possible was removed from the sample. The integument from each individual was then divided into halves; one half was heat-shocked, while the other was used as a control.

The tissue was then rinsed in Grace's medium and cultured as described by Kiely and Riddiford (1985) for 2 h to allow the tissue to adjust to culture conditions. Each sample was subsequently transferred to 500 µl heated Grace's medium in a temperature-regulated incubator set at 42 °C for heat-shocked tissue and 27 °C for the controls. After 1 h the tissue was placed into 250 µl of heated (or control) Grace's medium that lacked leucine but contained 125 µCi ³H-leucine (New England Nuclear) and cultured for 1 additional hour to allow radiolabelling of newly synthesized protein. The epidermis was then separated from the cuticle, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -70 °C.

Homogenization and electrophoresis :

Each sample of epidermis was placed into 30 µl of homogenization buffer (Kiely and Riddiford, 1985) and sonicated 15 min in an ultrasound bath (Bransom Ultrasonic Cleaner). Each sample was then spun 15 min in an Eppendorf centrifuge and the resulting supernatant was saved.

Equal numbers of TCA-precipitable counts (Wolfgang and Riddiford, 1986) from each sample were electrophoresed on 12 % polyacrylamide-SDS slab gels at 20 mA constant current (Ames, 1974) using a water-cooled electrophoresis apparatus (BioRad). Molecular weight standards ranging from 14.4 to 94 kD (Pharmacia) were also run on each gel and subsequently stained with Coomassie Blue dye. To visualize tritiated proteins, gels were fluorographed according to the procedure of Laskey and Mills (1975).

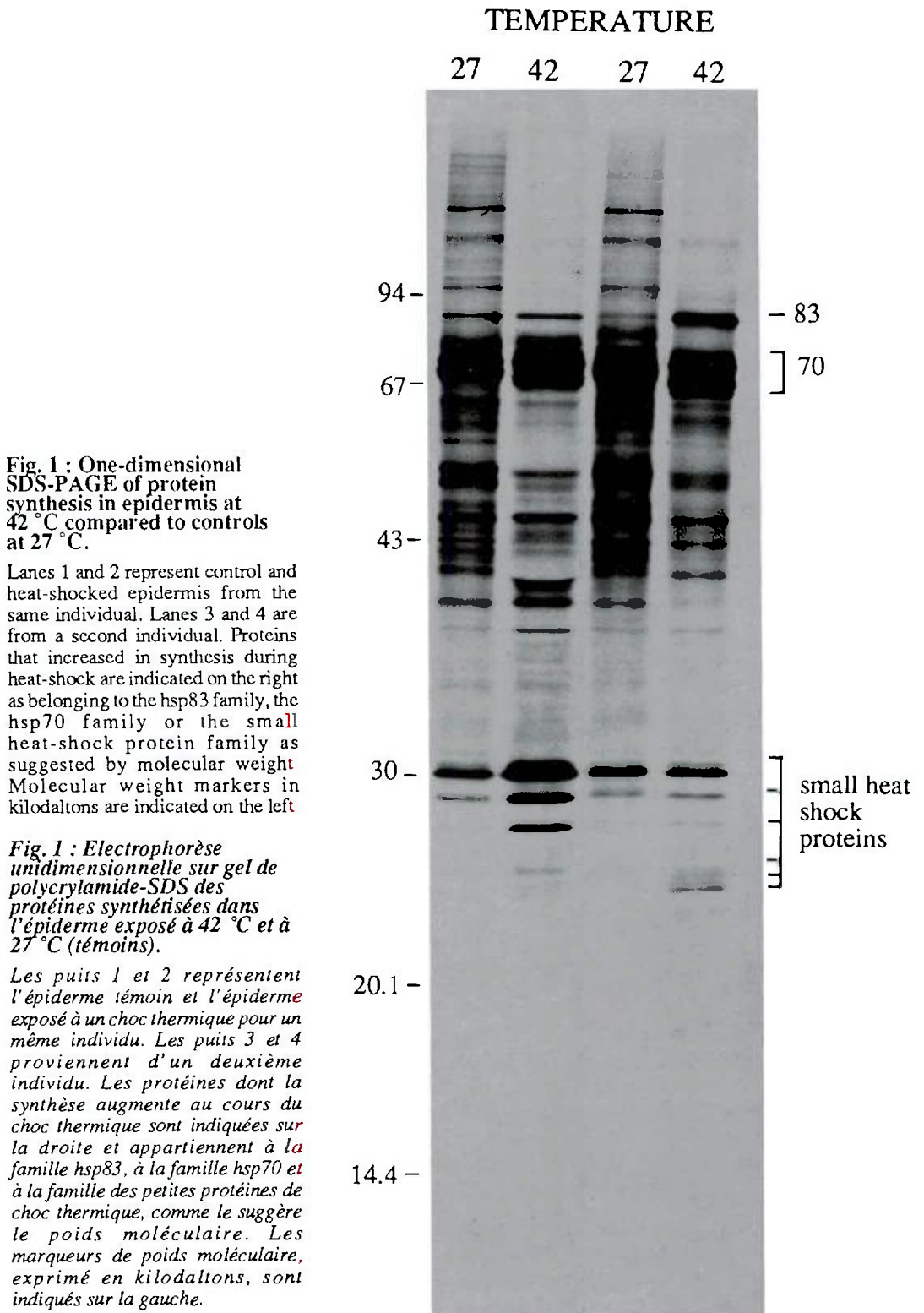
RESULTS

Heat sensitivity of larvae :

When fifth instar larvae were heat-shocked at 42 °C and then returned to 27 °C and allowed to develop, all animals resumed feeding and spun normal cocoons (n = 9). Only 5 of 9 animals resumed feeding after 1 h at 44 °C ; 3 of those animals later spun cocoons. None of the 5 animals heat-shocked at 46 °C resumed feeding ; all died within 24 h.

Heat-shock protein synthesis :

Figure 1 shows patterns of protein synthesis in epidermis incubated at 27 °C (controls) and at 42 °C. Incubation at 42 °C induced synthesis of several apparent heat-shock proteins; one at approximately 84 kD, 2 proteins near 70 kD, 3 proteins of 31, 30 and 29 kD, and 3 proteins near 26 kD. Although some of the proteins produced at 27 °C were no longer produced at 42 °C (especially those above 96 kD), synthesis of many proteins persisted at high temperature. In one animal, synthesis of a protein near 40 kD also appeared to increase at 42 °C (lane 2 of Fig. 1).



DISCUSSION

The results indicate that the heat-shock response of *Bombyx mori* involves the synthesis of heat-shock proteins that, according to molecular weight, seem to belong to the three heat-shock protein families first described in *Drosophila* (Lindquist, 1980): the hsp82 family, the hsp70 family, and the small heat-shock-protein family. This finding is also consistent with reports of heat-shock proteins in *Bombyx* embryos (Dorel and Coulon, 1988). These families have also been described in numerous other insects (see Fittinghoff and Riddiford, 1990).

Because these experiments were performed on the epidermis, the same tissue used in experiments involving another lepidopteran, *Manduca sexta*, a comparison of the heat-shock responses of *Bombyx* and *Manduca* is of particular interest. Coincidentally, the highest temperature tolerated by larvae of both species was 42 °C (see Results; Fittinghoff and Riddiford, 1990). In both species, synthesis of non-heat-shock proteins (those proteins that are normally synthesized at the usual rearing temperature) persisted at 42 °C, although synthesis of some proteins was somewhat reduced in *Bombyx*.

In both species, synthesis of an epidermal protein of approximately 40 kD was affected by heat-shock. In *Manduca*, synthesis of a 40 kD protein called ep40 was decreased. In contrast, synthesis of the *Bombyx* protein seemed to increase, but only in one of the individuals tested. Because of this difference in response, it seems likely that the similarity in molecular weight is coincidence. This variability in the *Bombyx* response may reflect slight age differences (although the individuals were matched in weight) or individual variation. The variability is not due to sex differences since all of the animals were male.

The persistence of non-heat-shock protein synthesis in *Bombyx* and *Manduca* contrasts strongly with the nearly complete repression of non-heat-shock protein synthesis that has been observed in *Drosophila melanogaster* (Lindquist, 1980). There are at least two possible explanations of this difference between *Drosophila* and the other insects. First, the difference may reflect the different phylogenetic histories of these insects. *Bombyx* and *Manduca* are both members of the Lepidoptera, whereas *Drosophila* belongs to the Diptera. In addition, *Locusta migratoria*, a member of the Orthoptera, also lacks the repression during heat shock of non-heat-shock protein synthesis (Whyard *et al.*, 1986). Repression of non-heat-shock protein synthesis may thus be unique to the Diptera and not found in other insect orders. However, recent evidence from the gypsy moth, *Lymantria dispar*, indicates that repression of non-heat-shock protein synthesis does occur in at least some Lepidoptera (Yocum *et al.*, 1991), making the phylogenetic hypothesis less tenable.

A second hypothesis is that the difference could reflect adaptations to different environmental temperatures. The three species which appear to lack repression of non-heat-shock protein synthesis, *Bombyx mori*, *Locusta migratoria* (Whyard *et al.*, 1987), and *Manduca sexta* (Fittinghoff and Riddiford, 1990) all show some adaptation to high environmental temperature, being tolerant of much higher temperatures than *Drosophila melanogaster* (Lindquist, 1980). As discussed by Fittinghoff and Riddiford (1990), the ability to maintain normal protein synthesis during heat-shock may be an advantage for insects adapted to hot climates. Because the Mysore strain of *Bombyx* used in these experiments may, by virtue of its origin in India, be more heat-tolerant than other strains, future research on the heat-shock responses of other *Bombyx* strains may help elucidate this point.

The epidermal heat-shock response of *Bombyx* differs from that of another lepidopteran insect, *Manduca sexta*, in that heat-shock apparently does not increase synthesis of any leucine-containing proteins smaller than 20 kD, proteins that have been identified as cuticular proteins (Fittinghoff and Riddiford, 1990; Lohmann and Riddiford, 1992). The production of cuticular proteins in response to heat shock does not seem therefore to be a universal characteristic of Lepidoptera.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Marian Goldsmith for kindly providing *Bombyx* larvae and mulberry leaves and Dr Kiyoshi Hiruma for help in rearing the animals. The work was supported by NSF DCB 85-10875, CMFL was supported by PHS NRSA 5 T32 GMO7270.

REFERENCES

- AMES G.F. (1974) Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. *J. Biol. Chem.*, 249, 634-644.
- BULTMANN H. (1986) Heat shock responses in polytene footpad cells of *Sarcophaga bullata*. *Chromosoma*, 93, 347-357.
- CARVALHO M.G.C., REBELLO M.A. (1987) Induction of heat shock proteins during growth of *Aedes albopictus* cells. *Insect Biochem.*, 17, 199-206.
- CHIRICO W., WATERS M.G., BLOBEL G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332, 228-232.
- DESHAIES R.J., KOCH B.D., WERNER-WASHBURNE M., CRAIG E.A., SCHEKMAN R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, 332, 800-805.
- DOREL C., COULON M. (1988) Regulation of gene expression in prediapausing embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: pattern of protein synthesis. *Cell differentiation*, 23, 87-92.
- FITTINGHOFF C.M., RIDDIFORD L.M. (1990) Heat sensitivity and protein synthesis during heat-shock in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. B.*, 160, 349-356.
- KIELY M.L., RIDDIFORD L.M. (1985) Temporal programming of epidermal cell protein synthesis during the larval-pupal transformation of *Manduca sexta*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, 194, 325-335.
- LASKEY R.A., MILLS A.D. (1975) Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, 56, 335-341.
- LINDQUIST S. (1980) Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: implications for regulation. *Devel. Biol.*, 77, 463-479.
- LOHMANN C.M.F., RIDDIFORD L.M. (1992) Synthesis and secretion of low molecular weight cuticular proteins during heat shock in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Exp. Zool.*, 262, 374-382.
- STEPHANOU G., ALAHOTIS S.N., MARMARAS V.J., CHRISTODOULOU C. (1983) Heat shock response in *Ceratitis capitata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B, 425-432.
- STEPHANOU G. (1992) On the control of heat-shock protein synthesis in *Drosophila melanogaster* and *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem.*
- VINCENT M., TANGUAY R.M. (1979) Heat-shock induced proteins present in the cell nucleus of *Chironomus tentans* salivary gland. *Nature*, 281, 501-503.
- WHYARD S., WYATT G.R., WALKER V.K. (1986) The heat shock response in *Locusta migratoria*. *J. Comp. Physiol. B.*, 156, 813-817.
- WOLFGANG W.J., RIDDIFORD L.M. (1986) Larval cuticular morphogenesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its hormonal regulation. *Devel. Biol.*, 113, 305-316.
- YOCUM G.D., JOPLIN K.H., DENLINGER D.L. (1991) Expression of heat shock proteins in response to high and low temperatures extremes in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.*, 18, 239-249.

REACTION AU CHOC THERMIQUE ET SENSIBILITE A LA CHALEUR DE *BOMBYX MORI*

C.M.F. LOHMANN* & L.M. RIDDIFORD

Department of Zoology, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA.

*Lorsqu'ils sont exposés à une température élevée, de nombreux organismes répondent au choc thermique par une synthèse nouvelle des protéines de choc thermique. Nous démontrons ici que la réaction au choc thermique de *Bombyx mori* est similaire à celle d'autres insectes en cela qu'elle induit la production de trois groupes de protéines de choc thermique. La réaction au choc thermique de *Bombyx mori* diffère de celle de *Drosophila* car la répression de la synthèse des protéines non liées au choc thermique ne constitue pas la caractéristique principale de la réaction. A cet égard, la réaction au choc thermique de *Bombyx mori* ressemble à celle de *Manduca*. Cette différence de synthèse des protéines non liées au choc thermique pourrait correspondre soit à des différences phylogénétiques entre les ordres d'insectes, soit à la tolérance particulière de ces deux genres aux températures relativement élevées.*

INTRODUCTION

Lorsqu'elles sont soumises à de fortes températures, les cellules de divers organismes présentent une réaction au choc thermique caractérisée par la synthèse de protéines de choc thermique. La réaction au choc thermique d'insecte la mieux étudiée, celle de *Drosophila*, se traduit par une synthèse des protéines de choc thermique accompagnée d'une répression de la synthèse des protéines normales (Lindquist, 1980). Ce type de réaction au choc thermique est apparemment nécessaire à la survie cellulaire (Deshaies et coll., 1988 ; Chirico et coll., 1988), donc organismique, à température élevée.

Les détails de la réaction au choc thermique diffèrent considérablement en fonction des insectes. La taille et le nombre de protéines de choc thermique varie d'une espèce à l'autre aussi bien que la synthèse des protéines normales, non liées au choc thermique, au cours du choc thermique. Cette variation peut être liée soit à la phylogénie, soit à la tolérance à la chaleur de l'espèce. Par exemple, la répression de la synthèse des protéines normales au cours du choc thermique a tout d'abord été décrite chez les diptères (Carvalho et Rebello, 1987 ; Bultmann, 1986 ; Stephanou et coll., 1983 ; Stephanou, 1982 ; Lindquist, 1980 ; Vincent et Tanguay, 1979) et chez un lépidoptère (Yocum et coll., 1991) mais n'a pas été détectée chez *Manduca* (Fittinghoff et Riddiford, 1990) ni chez *Locusta migratoria* (Whyard et coll., 1986) qui sont tous deux des insectes tolérant des températures très élevées.

Cet article démontre que, chez *Bombyx* comme chez d'autres insectes, les protéines de choc thermique d'au moins trois familles (identifiées par leur poids moléculaire) sont synthétisées par réaction à la chaleur. Chez *Bombyx* comme chez *Manduca*, la synthèse des protéines non liées au choc thermique n'est pas réprimée de manière importante à haute température. La température maximale

* Adresse actuelle : Department of Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA.

que peuvent tolérer les larves de *Bombyx* est la même (42 °C) que celle que peuvent tolérer les larves de *Manduca*. Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle la synthèse continue des protéines normales au cours du choc thermique peut être associée aux insectes supportant des températures élevées.

MATERIELS ET METHODES

Détermination de la sensibilité des larves à la chaleur :

Des larves de *Bombyx mori* (souche Mysore) du cinquième âge fournies par le Dr Marian Goldsmith, de l'Université de Rhode Island, ont été élevées sous un cycle de lumière de 16L:8O à 27 °C et nourries de feuilles de mûrier. Les animaux ayant atteint un poids d'au moins 1 g ont été utilisés pour les expériences concernant la sensibilité à la chaleur. Les larves ont été placées individuellement dans des boîtes de Pétri préchauffées contenant une serviette en papier humide. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant 1 h à la température voulue. Après une heure, les animaux ont été replacés à 27 °C. Les animaux capables de filer des cocons sont considérés comme survivants.

Analyse de la synthèse des protéines au cours du choc thermique :

Le tégument abdominal dorsal, prélevé sur les larves mâles du cinquième âge pesant au moins 1 g, a été disséqué dans un milieu stérile de Grace (Gibco). Tout le corps adipeux et autant de muscle que possible ont été éliminés de l'échantillon. Le tégument de chaque individu a été ensuite coupé en deux : une moitié a été soumise au choc thermique tandis que l'autre a servi de témoin.

Le tissu a ensuite été rincé dans le milieu de Grace et cultivé selon le protocole décrit par Kiely et Riddiford (1985) pendant 2 h pour permettre au tissu de s'adapter aux conditions de culture. Chaque échantillon a ensuite été déposé dans 500 µl de milieu de Grace dans un incubateur régulé à 42 °C pour les tissus soumis au choc thermique et à 27 °C pour les témoins. Après une heure, le tissu a été placé dans 250 µl de milieu de Grace chauffé (ou témoin) sans leucine mais contenant 125 µCi³ H-leucine (New England Nuclear) et cultivé pendant encore 1 h pour permettre le radiomarquage des protéines nouvellement synthétisées. L'épiderme a ensuite été séparé de la cuticule, immédiatement congelé dans de l'azote liquide et stocké à -70 °C.

Homogénéisation et électrophorèse :

Chaque échantillon d'épiderme a été placé dans 30 µl de tampon d'homogénéisation (Kiely et Riddiford, 1985) et soniqué pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons (Bransom Ultrasonic Cleaner). Chaque échantillon a ensuite été centrifugé pendant 15 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf et le surnageant obtenu a été conservé.

Des fractions précipitables à l'ATC contenant une quantité égale de radioactivité (Wolfgang et Riddiford, 1986) de chaque échantillon ont été soumises à électrophorèse sur des gels en plaques SDS-polyacrylamide sous un courant constant de 20 mA (Ames, 1974) à l'aide d'un appareil d'électrophorèse à refroidissement par eau (BioRad). Les standards de poids moléculaire situés entre 14,4 et 94 kD (Pharmacia) ont été également soumis à la migration sur chaque gel et ensuite colorés avec du bleu de Coomassie. Afin de visualiser les protéines triuées, les gels ont été fluorographiés selon la procédure de Laskey et Mills (1975).

RESULTATS

Sensibilité des larves à la chaleur :

Lorsque les larves du cinquième âge sont exposées au choc thermique à 42 °C puis replacées à 27 °C pour permettre leur développement, tous les animaux recommencent à se nourrir et filent des cocons normaux (n = 9). Seulement 5 des 9 animaux recommencent à se nourrir après 1 heure à 44 °C ; 3 des ces animaux filent leurs cocons. Aucun des 5 animaux exposés à 46 °C n'a recommencé à se nourrir, tous sont morts dans les 24 h.

Synthèse des protéines de choc thermique :

La figure 1 présente les profils de synthèse des protéines dans l'épiderme incubé à 27 °C (témoins) et à 42 °C. L'incubation à 42 °C induit la synthèse de plusieurs protéines de choc thermique apparentes : 1 protéine à environ 84 kD, 2 protéines près de 70 kD, 3 protéines de 31, 30 et 29 kD et 3 protéines près de 26 kD. Bien que certaines des protéines produites à 27 °C ne soient plus produites à 42 °C (particulièrement celles qui sont supérieures à 96 kD), la synthèse de nombreuses protéines persiste à haute température. Chez l'un des animaux, la synthèse d'une protéine près de 40 kD semble également augmenter à 42 °C (puits 2 de la figure 1).

DISCUSSION

Les résultats indiquent que la réaction au choc thermique de *Bombyx mori* entraîne la synthèse de protéines de choc thermique qui, d'après le poids moléculaire, semblent appartenir aux trois familles de protéines de choc thermique préalablement décrites chez *Drosophila* (Lindquist, 1980) : la famille des hsp82, la famille des hsp70 et la famille des petites protéines de choc thermique. Ce résultat est également conforme aux observations de protéines de choc thermique chez les embryons de *Bombyx* (Dorel et Coulon, 1988). Ces familles ont également été décrites chez un grand nombre d'autres insectes (voir Fittinghoff et Riddiford, 1990).

Ces expériences ayant été réalisées sur l'épiderme, tissu également utilisé dans des expériences portant sur un autre lépidoptère, *Manduca sexta*, la comparaison des réactions au choc thermique de *Bombyx* et *Manduca* est particulièrement intéressante. Par effet de coïncidence, la température la plus élevée tolérée par les larves des deux espèces est 42 °C (voir Résultats : Fittinghoff et Riddiford, 1990). Chez les deux espèces, la synthèse des protéines non liées au choc thermique (les protéines normalement synthétisées à la température d'élevage habituelle) persiste à 42 °C, bien que la synthèse de certaines protéines diminue quelque peu chez *Bombyx*.

Chez les deux espèces, la synthèse d'une protéine épidermique d'environ 40 kD est affectée par le choc thermique. Chez *Manduca*, la synthèse d'une protéine de 40 kD, appelée ep40, diminue. Par contraste, la synthèse de la protéine de *Bombyx* semble augmenter mais seulement chez un seul des individus testés. Du fait de cette différence de réaction, il semble probable que la similitude des poids moléculaires soit une coïncidence. Cette variabilité de la réaction de *Bombyx* pourrait refléter de légères différences d'âge (bien que tous les individus soient d'un même poids) ou une variation individuelle. La variabilité n'est pas due à des différences de sexe car tous les animaux étaient mâles.

La persistance de la synthèse de protéines non liées au choc thermique chez *Bombyx* et *Manduca* contraste fortement avec la répression presque totale de la synthèse des protéines non liées au choc thermique qui a été observée chez *Drosophila melanogaster* (Lindquist, 1980). Il y a au moins deux explications plausibles à cette différence entre *Drosophila* et les autres insectes. En premier lieu, la différence pourrait refléter les différents passés phylogénétiques de ces insectes : *Bombyx* et *Manduca* sont tous deux membres des lépidoptères, tandis que *Drosophila* fait partie des diptères. Par ailleurs, *Locusta migratoria*, membre des orthoptères, ne présente pas non plus de répression de la synthèse des protéines normales au cours du choc thermique (Whyard et coll., 1986). La répression de la synthèse des protéines non liées au choc thermique pourrait donc être spécifique des diptères et ne pas exister chez les autres ordres d'insectes. Cependant, on a récemment mis en évidence chez *Lymantria dispar* que la répression de la synthèse des protéines non liées au choc thermique se produit chez certains lépidoptères au moins (Yocum et coll., 1991), ce qui rend moins plausible l'hypothèse phylogénétique.

La seconde hypothèse est que la différence pourrait refléter des adaptations aux différentes températures de l'environnement. Les trois espèces qui semblent ne pas donner de répression de synthèse des protéines non liées au choc thermique, *Bombyx mori*, *Locusta migratoria* (Whyard et coll., 1987) et *Manduca sexta* (Fittinghoff et Riddiford, 1990), présentent toutes une certaine adaptation à la haute température de leur milieu, tolérant des températures beaucoup plus élevées que *Drosophila melanogaster* (Lindquist, 1980). Comme l'ont démontré Fittinghoff et Riddiford (1990), la capacité à conserver une synthèse protéique normale au cours du choc thermique pourrait être un avantage chez les insectes adaptés aux climats chauds. La souche Mysore de *Bombyx* utilisée dans cette étude pouvant, de par son origine indienne, être plus tolérante à la chaleur que d'autres souches,

des recherches sur la réaction au choc thermique chez d'autres souches de *Bombyx* pourront permettre d'élucider ce point.

La réaction épidermique au choc thermique chez *Bombyx* diffère de celle d'un autre lépidoptère, *Manduca sexta*, dans le sens où le choc thermique ne semble pas accroître la synthèse d'aucune des protéines contenant de la leucine et pesant moins de 20 kD, protéines qui ont été identifiées comme étant des protéines cuticulaires (Fittinghoff et Riddiford, 1990 ; Lohmann et Riddiford, 1992). La production de protéines cuticulaires par réaction au choc thermique ne semble donc pas être une caractéristique commune à tous les lépidoptères.

GENETIC PATH NETWORK AMONG QUANTITATIVE CHARACTERS IN *BOMBYX MORI* L.

LI W.

Shaanxi Sericultural Research Institute, Yoachang Road, 10, Zhouzhi, Shaanxi, China.

A set of 49 hybrids obtained by crossing 7 Chinese races with 7 Japanese races according to partial diallel cross design was reared in a randomized complete block experiment. Genetic correlation coefficients among 22 quantitative characters were investigated and estimated. Based on the genetic correlation, internal relations of the characters in growth and development, and requirement of breeding aims, causal relationships among the characters and their relative importance were analysed with the method of path coefficients. The results were given out in the path network figure.

Keywords : *Bombyx mori* L., quantitative characters, genetic path coefficient.

INTRODUCTION

A lot of characters are measured in breeding of *Bombyx mori* L. They are related with one another intricately and some of them even display mutual causal relationships. Path analyses which turn simple correlation coefficients into algebraic sums of direct and indirect effects have been made to examine the relative importance of causal characters for resultant factors by Lili (1983), Fangrong (1984), Jialong (1984), Jiuge (1984), Mingguan (1987, 1990), Bihua (1987), Xiaoyin (1988) and Fengling (1988). All these studies, however, involved too little traits or failed to make clear the complicated causal relationships among characters.

In path analysis, some characters with no significant relation to the result could be rid of in order to avoid overelaborate troubles. This should depend on the internal relationships of characters in the growth and development and on the purposes of breeding, but not on subjective assumption.

This study was intended to examine the genetic path relationships among important quantitative characters in *Bombyx mori* L. and provide reference for breeding programmes.

MATERIALS AND METHODS

A set of 49 hybrids obtained by crossing 7 Chinese races (Huahe, Chunlei, Zhelei, Jingson A, Suhua, 731 and 781) with 7 Japanese races (Dongfei, Mingzhu, Chunxiao, Haoyue A, Chunhui, 732 and 782) according to the partial diallel cross design (7×7) without reciprocal was reared in a randomized complete block design with four replications. All of these races were the parents of released hybrids in China.

Observations were made on the following 22 characters : hatchability, larval duration, 5th instar duration, cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell ratio, bave weight, bave size, bave length, reelability percentage, bave length reeled, percentage of raw silk, pupation rate, cocoon yield per ten thousand larvae brushed, cocoon shell yield per ten thousand larvae brushed, silk yield per ten thousand larvae brushed, weight of food ingested, weight of food digested, digestion ratio, cocoon conversion efficiency (cocoon yield/food weight ingested), shell conversion efficiency (cocoon shell yield/food weight ingested) and silk conversion efficiency (silk yield/food weight ingested). The last

Table I. Genetic correlation coefficients among characters.

Tableau I. Coefficients de corrélation génétique entre les caractères.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2	-.03																				
3	-.04	.81																			
4	.01	.46	.41																		
5	-.28	.63	.56	.72																	
6	-.31	.48	.55	.02																	
7	-.21	.65	.69	.67	.91	.79															
8	.11	.48	.32	.56	.44	.22	.53														
9	-.26	.32	.44	.34	.66	.78	.74	-.23													
10	.18	-.38	-.42	-.24	-.33	-.49	-.35	.13	-.36												
11	-.02	.29	.34	.38	.55	.52	.66	.04	.76	.24											
12	-.26	-.30	-.26	-.19	.74	.88	.87	.27	.89	-.31	.65										
13	-.10	.51	.68	-.05	.04	-.15	-.19	.37	.20	.06	.04	.15									
14	-.09	-.10	-.03	.65	.41	.02	.20	.31	-.31	-.06	-.09	-.17	.71								
15	-.28	.33	.24	.47	.95	.75	.8	-.09	.75	.20	.55	.61	.25	.72							
16	-.23	.31	.61	.15	.68	.64	.85	.16	.57	.17	.72	.77	.14	.30	.86						
17	.26	.18	.07	.82	.80	.20	.77	.21	.27	.10	.09	.04	.21	.15	.11	.09					
18	.33	.01	-.06	.74	.70	.14	.65	.11	.31	-.08	.12	.08	.10	.21	.14	.10	.76				
19	-.25	-.09	-.24	.43	.41	-.21	.41	.03	.07	.02	.14	.01	.04	.04	.01	.06	.05	.76			
20	-.17	.20	-.03	.28	-.11	-.34	-.25	.16	-.25	-.19	-.31	-.33	-.03	.77	.01	-.09	-.88	-.31	.63		
21	-.34	.28	.40	.17	.87	.88	.74	-.25	.82	-.36	.47	.49	.07	.48	.97	.73	.24	.21	-.28	-.04	
22	-.33	-.02	.19	-.03	.62	.67	.77	.00	.66	.10	.67	.78	.23	.20	.72	.95	.23	.20	-.10	.32	.62

Legend to Table I / Légende du tableau I :

- 1 : hatchability / *taux d'éclosion* ;
- 2 : larval duration / *durée larvaire* ;
- 3 : 5th instar duration / *durée du 5^e âge* ;
- 4 : cocoon weight / *poids du cocon* ;
- 5 : cocoon shell weight / *poids de la coque* ;
- 6 : cocoon shell ratio / *richesse soyeuse* ;
- 7 : bave weight / *poids de la bave* ;
- 8 : bave size / *titre de la bave* ;
- 9 : bave length / *longueur de la bave* ;
- 10 : reelability percentage / *pourcentage de dévidabilité* ;
- 11 : bave length reeled / *longueur de bave dévidée* ;
- 12 : raw silk percentage / *pourcentage de soie grège* ;
- 13 : pupation rate / *taux de pupaison* ;
- 14 : cocoon yield per 10,000 larvae brushed / *rendement en cocons pour 10 000 larves levées* ;
- 15 : shell yield per 10,000 larvae brushed / *rendement en coques pour 10 000 larves levées* ;
- 16 : silk yield per 10,000 larvae brushed / *rendement en soie pour 10 000 larves levées* ;
- 17 : ingested food weight / *poids de nourriture ingérée* ;
- 18 : digested food weight / *poids de nourriture digérée* ;
- 19 : digestion ratio / *taux de digestion* ;
- 20 : cocoon conversion efficiency / *efficacité de la conversion en cocons* ;
- 21 : shell conversion efficiency / *efficacité de la conversion en coque* ;
- 22 : silk conversion efficiency / *efficacité de la conversion en soie*.

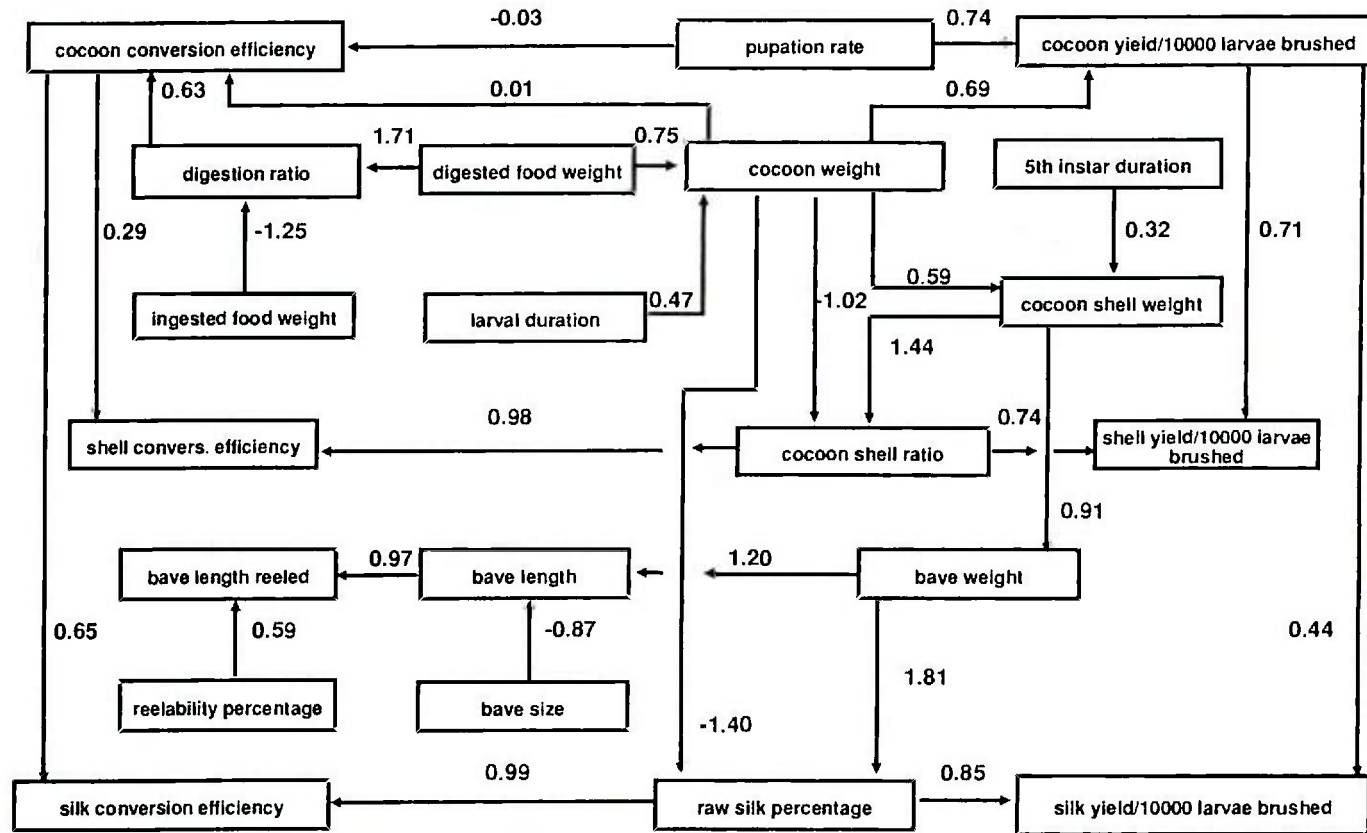


Fig. 1 : Genetic path network among quantitative characters in *Bombyx mori* L.

Fig. 1 : Réseau génétique entre les caractères quantitatifs de *Bombyx mori* L.

six indexes were computed with the dry weight of cocoon, cocoon shell, silk, food, remnant food and excrement under good feeding conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Genetic correlation coefficients among all the characters were assessed after variance analyses which had proved that these traits showed significant differences among the hybrids. Hatchability was not included in the later steps because its relation to the other characters was found non significant (as shown in Table I).

The causal relationships among the characters were analysed based on the multiplicate relations of these traits, sequence of growth and development and purposes of breeding. The path coefficients in the network figure (Fig. 1) were estimated with the genetic correlation coefficients. The correlation lines were omitted in order to keep the figure clear. But all the relative correlation coefficients are shown in Table I.

According to the network figure, silk conversion efficiency, which is the most important purpose of *Bombyx mori* breeding, can be considered as the result of two major components, i.e. percentage of raw silk ($P = 0.99$) and cocoon conversion efficiency ($P = 0.65$). The percentage of raw silk depends mainly on the positive effect of have weight ($P = 1.81$) and the negative influence of cocoon weight ($P = -1.40$). Both cocoon conversion efficiency and cocoon weight, however, are closely related with the causes of ingestion and digestion. Larval duration also makes contribution to cocoon weight ($P = 0.47$).

Silk yield per ten thousand larvae brushed is another important resultant character, considering the cost of egg reproduction. It is affected by the percentage of raw silk ($P = 0.85$) and cocoon yield per ten thousand larvae brushed ($P = 0.44$). The cocoon yield per ten thousand larvae brushed is the result of pupation rate ($P = 0.74$) and cocoon weight ($P = 0.69$).

Consequently, for the aim of raising silk conversion efficiency and silk yield per ten thousand larvae brushed, cocoon conversion efficiency, percentage of raw silk and cocoon yield per ten thousand larvae brushed could go up with the improvement of ingestion and digestion properties and pupation rate. Cocoon weight should keep on an appropriate level because its direct negative effect on the percentage of raw silk ($P = -1.40$) is approximately equal to the sum of its indirect positive influence on the percentage of raw silk ($P = 0.59 \times 0.91 \times 1.81 = 0.97$) and on the silk yield per ten thousand larvae brushed ($P = 0.69 \times 0.44 = 0.30$).

The have length reeled, have size and so on, as the indexes of silk quality, are not directly related to yield characters, except have weight which contributes to have length. So the unfavourable correlations between silk quality characters and yield targets as shown in Table I can be overcome with appropriate selection methods.

The other characters in Fig. 1, such as cocoon shell ratio, are regarded as intermediate traits which play an important role in indirect selection.

These results lead to the conclusion that a great attention should be paid to the improvement of feed efficiency and vitality in the breeding of *Bombyx mori*. In order to raise the percentage of raw silk, cocoon shell weight and have weight should be selected towards higher, but cocoon weight must keep on an appropriate level. So cocoon shell ratio, as a comprehensive index of cocoon weight and cocoon shell weight, turns to be a great important character in breeding.

REFERENCES

- BIHUA Y. (1987) Path analysis of some economic characters in *Bombyx mori*. Bull. of Sericulture, 18(3), 15-18.
 FANGRONG Z. (1984) Studies on the heritability of some quantitative characters in *Bombyx mori* and the genetic correlation between these characters. Science of Sericulture, 10(3), 145-152.
 FENGLING F. (1988) Relative importance of some genetic factors to silk conversion efficiency in *Bombyx mori*. Shaanxi Sericulture, 9(1), 10-12.

- JIALONG D. (1984) Path analysis of some quantitative characters in *Bombyx mori* L.. Sericultural Science and Technology of Anhui, 3, 4-8.
- JIUGE F. (1984) Study on path coefficient analysis of main quantitative characters in *Bombyx mori*. Agricultural Science of Anhui, 4, 88-95.
- LILI Y. (1983) The estimates of heritability of pupal weight, cocoon shell weight and number of eggs laid in *Bombyx mori* and the genetic correlation between these characters and path coefficient analysis. Science of Sericulture, 9(3), 149-155.
- MINGGUAN Y. (1987) A network of genetic path of some quantitative characters in *Bombyx mori*. Science of Sericulture, 13(4), 213-216.
- MINGGUAN Y. (1990), Genetic path analysis of feed efficiency in *Bombyx mori*. Learned J. of Zhejiang Agricultural Univ., 16(4), 431-435.
- XIAOYIN Y. (1988) Path analysis of some quantitative characters in *Bombyx mori* L. Science of Sericulture, 14(1), 21-24.

RELATIONS GENETIQUES ENTRE LES CARACTERES QUANTITATIFS CHEZ *BOMBYX MORI* L.

LI W.

Shaanxi Sericultural Research Institute, Yoachang Road, 10, Zhouzhi, Shaanxi, Chine.

Un ensemble de 49 hybrides obtenus par croisement de 7 races chinoises avec 7 races japonaises selon la méthode des croisements dialléliques partiels a été élevé suivant la configuration des blocs aléatoires. On a étudié et évalué les coefficients de corrélation génétiques entre 22 caractères quantitatifs. Sur la base de la corrélation génétique, des relations internes entre des caractères de croissance et de développement ainsi que les finalités de la sélection, les relations de causalité entre les caractères et leur importance relative ont été analysées à l'aide de la méthode des coefficients trajectométriques. Les résultats sont rassemblés sous forme d'un réseau d'interactions génétiques.

INTRODUCTION

De nombreux caractères sont mesurés dans le cadre de la sélection chez *Bombyx mori* L. Ils sont reliés les uns aux autres de manière complexe et certains présentent même des relations causales réciproques. Des analyses trajectométriques, qui permettent de convertir les coefficients de corrélation en sommes algébriques des effets directs et indirects, ont été réalisées pour déterminer l'importance relative des caractères de causalité dans les facteurs résultants par Lili (1983), Fangrong (1984), Jialong (1984), Jiuge (1984), Mingguan (1987, 1990), Bihua (1987), Xiaoyin (1988) et Fengling (1988). Cependant, toutes ces études portaient sur un nombre insuffisant de caractères et n'ont pas permis d'élucider les relations causales complexes entre les caractères.

Dans l'analyse trajectométrique, certains caractères sans relation significative avec le résultat, peuvent être éliminés afin d'écarter les problèmes trop complexes. Ceci devrait dépendre des relations internes entre les caractères de croissance et de développement et de la finalité de la sélection, mais pas de présomptions subjectives.

Cette étude vise à examiner les relations entre les voies génétiques parmi les caractères quantitatifs importants chez *Bombyx mori* L. et permettre de disposer de références dans les programmes de sélection.

MATERIELS ET METHODES

Un lot de 49 hybrides obtenus par croisement de 7 races chinoises (Huahe, Chunlei, Zhelei, Jingson A, Suhua, 731 et 781) avec 7 races japonaises (Dongfei, Mingzhu, Chunxiao, Haoyue A, Chunhui, 732 et 782) suivant la méthode des croisements dialléliques partiels (7 × 7) sans réciproques a été élevé selon la configuration des blocs aléatoires avec quatre réplicats. Toutes ces races sont les parentes d'hybrides utilisés en Chine.

Les observations portent sur les 22 caractères suivants : taux d'éclosion, durée larvaire, durée du 5e âge, poids du cocon, poids de la coque, richesse soyeuse, poids de la bave, titre de la bave, longueur de la bave, pourcentage de dévidabilité, longueur de bave dévidée, pourcentage de soie grège, taux de pupaison, rendement en cocons pour 10 000 larves levées, rendement en coque pour 10 000 larves levées, rendement en soie pour 10 000 larves levées, poids de la nourriture ingérée, poids de la nourriture digérée, taux de digestion, efficacité de conversion en cocons (rendement en cocons/poids de nourriture ingérée) efficacité de conversion en coques (rendement en coques/poids de nourriture

ingérée) et efficacité de conversion en soie (rendement en soie/poids de nourriture ingérée). Les six derniers indices sont calculés à partir du poids sec du cocon, de la coque, de la soie, de la nourriture, du restant de nourriture et d'excréments dans de bonnes conditions de nourrissage.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les coefficients de corrélation génétique entre tous les caractères sont évalués d'après les analyses de variance qui font apparaître des différences significatives entre les hybrides pour ces caractères. Le taux d'éclosion n'est pas pris en compte pour les derniers stades expérimentaux car sa relation avec les autres caractères n'est pas significative.

Les relations causales entre les caractères ont été analysées en fonction des relations multiples de ces caractères, des séquences de croissance et de développement et des finalités de la sélection. Les coefficients des voies de la figure de réseau (Fig. 1) ont été calculés à l'aide des coefficients de corrélation génétique. Les droites de corrélation ont été omises pour ne pas surcharger la figure mais les coefficients de corrélations sont donnés dans le tableau I.

D'après la figure de réseau, l'efficacité de conversion en soie, qui est l'un des caractères les plus recherchés lors la sélection de *Bombyx mori*, peut être considérée comme le résultat de deux composants majeurs, c'est-à-dire le pourcentage de soie grège ($P = 0,99$) et l'efficacité de conversion en cocons ($P = 0,65$). Le pourcentage de soie grège dépend surtout de l'effet positif du poids de la bave ($P = 1,40$) et de l'influence négative du poids du cocon ($P = -1,40$). Cependant, l'efficacité de conversion en cocons et le poids de la coque sont étroitement liés aux causes d'ingestion et de digestion. La durée larvaire contribue également au poids du cocon ($P = 0,47$).

Le rendement en soie pour 10 000 larves levées constitue également un caractère final important, compte tenu du coût de la reproduction des oeufs. Il est influencé par le pourcentage de soie grège ($P = 0,85$) et par le rendement en cocons pour 10 000 larves levées ($P = 0,44$). Le rendement en cocons pour 10 000 larves levées résulte du taux de pupaison ($P = 0,74$) et du poids du cocon ($P = 0,69$).

Ainsi, pour augmenter l'efficacité de conversion en soie et le rendement en soie pour 10 000 larves levées, il serait possible d'optimiser l'efficacité de conversion en cocons, le pourcentage de soie grège et le rendement en cocons pour 10 000 larves levées en améliorant les propriétés d'ingestion et de digestion et le taux de pupaison. Le poids du cocon devrait être maintenu à un niveau approprié car son effet négatif direct sur le pourcentage de soie grège ($P = -1,40$) est sensiblement égal à la somme de son influence indirecte positive sur le pourcentage de soie grège ($P = 0,59 \times 0,91 \times 1,81 = 0,97$) et sur le rendement en soie pour 10 000 larves levées ($P = 0,69 \times 0,44 = 30$).

La longueur de bave dévidée, la longueur de la bave, etc. ne sont pas, en tant qu'indices de qualité de la soie, directement liées aux caractères du rendement, à l'exception du poids de la bave qui contribue à la longueur de la bave. C'est pourquoi les problèmes dûs aux corrélations négatives entre les caractères de la qualité de la soie et les rendements recherchés (Tableau I) peuvent être surmontés en utilisant des méthodes de sélection appropriées.

Les autres caractères de la figure 1, comme la richesse soyeuse, sont considérés comme des caractères intermédiaires qui jouent un rôle important dans la sélection indirecte.

Ces résultats permettent de conclure qu'il est nécessaire de s'intéresser à l'amélioration de l'efficacité du nourrissage et de la vitalité dans la sélection de *Bombyx mori*. Pour augmenter le pourcentage de soie grège, il faut sélectionner des valeurs fortes pour le poids de la coque et le poids de la bave, mais des valeurs adaptées pour le poids du cocon. Il apparaît donc que la richesse soyeuse, comme indice global du poids du cocon et du poids de la coque, est un caractère important de la sélection.

EFFECT OF N-NITROSO-N-ETHYLUREA ON THE INDUCTION OF DOMINANT LETHALS IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

M. ABDUS SALAM*, M. SAIFUL ISLAM, S. MAHFUZAR RAHMAN &
M. NAZMUL HAQUE

Department of Zoology, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh.

The effect of three doses of N-nitroso-N-ethylurea (NEU), viz., 20 mg, 25 mg and 30 mg, on the induction of dominant lethals in Nistari C140 breed of Bombyx mori L. has been studied. The chemical showed a significant effect ($P < 0.05$) on the induction of dominant lethals, and there was a linear relationship between the doses and the frequency of dominant lethals. Though the mutagen was unable to reduce fecundity in Bombyx mori L. significantly, there was a significant increase ($P < 0.05$) in the percentage of unhatched eggs after the mutagen treatment.

Keywords : N-nitroso-N-ethylurea (NEU), mono-functional alkylating agents, mutagens, dominant lethals.

INTRODUCTION

The mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., is the greatest source of natural silk and, out of nearly 1,000 varieties of silkworms (Bernett, 1963), only a few varieties including different strains of Nistari and Nistid with one or two hybrid races are reared in Bangladesh. Various attempts have been made to improve the indigenous race, Nistari, a poor silk-yielding strain, with a view to obtaining more silk. Rahman and Khan (1975) reported the effect of different types of mulberry leaves as diets on *B. mori*, while Ahmed (1980) observed effects by feeding different types of mulberry leaves plucked at different times of the day. Datta and Roy (1976) attempted to improve this race through selection; but due to its genetic homogeneity and consequently, negative response to selection, such an attempt has proved to be futile. Since quantitative traits are mostly controlled by polygenes, it is presumed that new genetic variability to the gene pool can be added by applying mutagens at different stages of this domestic race. Earlier studies on the production of dominant lethal mutations in *Drosophila melanogaster* by Ikebuchi and Nakao (1979) and Salam (1984a), on the induction of recessive lethal mutations by Vogel and Leigh (1975) in the same organism have shown that mono-functional alkylating agents are capable of exerting their mutagenic effects in *D. melanogaster*. Studies with Chinese hamsters (Seleznev, 1976), silkworms (Murakami, 1973, 1975; Murota and Murakami, 1977; Datta *et al.*, 1978; Kerimova, 1978; Tazima and Onimara, 1968), mice (Russel and Montgomery, 1982; Sega and Owens, 1983) and *Ambystoma* (Armstrong and Fletcher, 1983) reveal that, by applying such agents, induced mutagenesis can be brought about in a great variety of organisms. Recently, Pai *et al.* (1985) and Gaur and Mehrotra (1986) have reported the effects of

* To whom correspondence should be addressed

Apron 35 SD and ethyl methane sulfonate on the mulberry silkworm and wild tasar silkworm, respectively. Murakami (1985) has also induced mutation in *B. mori* with the treatment of aflatoxin B₁. The present investigation was aimed at evaluating the effect of NEU on the induction of dominant lethals in the mulberry silkworm, *B. mori* L.

MATERIALS AND METHODS

Nistari C/40, a standard multivoltine breed of *B. mori* L., the eggs of which were procured from the mulberry silkworm germplasm bank of Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, was used for experimental purposes. The standard rearing technique (Krishnaswami, 1978) was followed throughout the experiment. The eggs were incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and at $80 \pm 5\%$ RH. For estimation of dominant lethals 8 replications were used in each untreated (control) and NEU-treated line. The experiment was conducted through parental to F₁ generation, the latter had three selective crosses for every dose. Three doses of the mutagen were prepared by taking 20, 25 and 30 mg of NEU per 1 ml distilled water. During treatment, 1 ml solution of NEU was taken in a watch glass, was placed in an air-tight desiccator and left for 12 hours at 25°C . The estimation of dominant lethality was made by using the following formula (Proust *et al.*, 1972):

$$P_x = \frac{P_t - P_c}{100 - P_c} \times 100$$

where,

P_x = dominant lethals,

P_t = percentage of unhatched eggs in the treated line,

P_c = percentage of unhatched eggs in the control line.

The total number of eggs laid by an individual female gave the fecundity, while from the total number of blue-, dead-, and unfertilized eggs, the percentage of unhatched eggs was calculated for each replication.

RESULTS AND DISCUSSION

The results in Table I indicate that induction of dominant lethals in both parental and F₁ silkworms was enhanced by the increase of the doses of NEU. Similar results were also noted for the different selective crosses between the treated/control, male/females. Though non significant, the mutagen showed a general tendency to reduce fecundity in *B. mori* L. The percentage of unhatched eggs was found to increase with the increasing concentrations of the mutagen.

Statistical analyses of data from the F₁ generation (Table II) show that significant increases of dominant lethals ($P < 0.05$) and % unhatched eggs ($P < 0.05$) are brought about by NEU treatments. Dominant lethals and % unhatched eggs due to selective crosses are also highly significant ($P < 0.001$).

Though about 3.5 million chemicals are in use all over the world, very little evidence have been established with experiments in *B. mori* as the test system. From the studies of Aslaniyan and Smirnova (1981), NEU has been proved to be a mono-functional alkylating super mutagen, which is capable of producing a well-defined spectrum of ethyl attacks in the DNA of treated cells. Earlier investigations by Generoso *et al.* (1974), Brewen *et al.* (1975) and Lang and Adler (1977) have shown that the dominant lethal mutations are generally produced by the small deletions, chromosome breakage and translocations. In the present study, there is a linear relationship between the increase in NEU concentration and the increase in the induction of dominant lethals. These results are in good agreement with those of Corwin (1968), Lee (1978) and Ryo *et al.* (1981) who used N-nitrosomethylurea, ethylmethanesulfonate respectively in *D. melanogaster*. Our results also conform with those of Pai *et al.* (1985) who, by using Apron 35 SD in silkworms, have shown the

Table I. The effect of NEU on the induction of dominant lethals in the parental and F₁ generations, and in selective crosses of *B. mori* L.

Tableau I. Effet de N-nitroso-N-éthylurée (NEU) sur l'induction de mutations létales dominantes chez les générations parentales et F₁ et chez des croisements sélectifs de *B. mori* L.

Generations and selective crosses	Concentration of NEU (mg)	Fecundity (mean ± SE)	% Unhatched eggs (mean ± SE)	% NEU-induced dominant lethals (mean ± SE)
Génération et croisements sélectifs	Concentration de NEU (mg)	Fécondité (moyenne ± ET)	Pourcentage d'oeufs non éclos (moyenne ± ET)	Pourcentage de létaux dominants induits par NEU (moyenne ± ET)
Parental (C)	00	418.00 ± 21.53	6.14 ± 0.32	-
Parentales (C)	20	401.75 ± 21.88	20.66 ± 0.50	15.46 ± 2.05
	25	415.75 ± 20.29	25.23 ± 3.59	20.11 ± 2.95
	30	408.38 ± 20.58	30.92 ± 1.41	26.28 ± 0.24
F ₁ (C ^{MM} × C ^{FF})	00	427.75 ± 35.14	6.42 ± 0.41	-
F ₁ (T ₂₀ ^{MM} × T ₂₀ ^{FF})	20	393.62 ± 22.15	20.13 ± 1.18	14.65 ± 1.05
F ₁ (C ^{MM} × T ₂₀ ^{FF})	20	360.63 ± 23.84	12.02 ± 0.98	5.98 ± 0.95
F ₁ (T ₂₀ ^{MM} × C ^{FF})	20	427.88 ± 25.59	13.17 ± 0.93	7.21 ± 1.02
F ₁ (T ₂₅ ^{MM} × T ₂₅ ^{FF})	25	411.15 ± 17.62	26.01 ± 0.99	20.74 ± 2.16
F ₁ (C ^{MM} × T ₂₅ ^{FF})	25	388.75 ± 43.63	15.14 ± 0.61	9.09 ± 1.01
F ₁ (T ₂₅ ^{MM} × C ^{FF})	25	400.50 ± 18.61	15.92 ± 0.92	9.96 ± 0.53
F ₁ (T ₃₀ ^{MM} × T ₃₀ ^{FF})	30	415.25 ± 24.60	29.98 ± 1.61	24.96 ± 2.24
F ₁ (C ^{MM} × T ₃₀ ^{FF})	30	401.00 ± 19.86	16.77 ± 1.23	10.81 ± 1.12
F ₁ (T ₃₀ ^{MM} × C ^{FF})	30	409.00 ± 15.19	18.50 ± 1.21	12.66 ± 1.25

T₂₀, T₂₅ and T₃₀ refer treatments with 20 mg, 25 mg and 30 mg concentrations of NEU, respectively.

T₂₀, T₂₅ et T₃₀ correspondent respectivement aux traitements avec des concentrations de 20 mg, 25 mg et 30 mg de NEU.

C : Control / Témoin.

M : Male / Mâle.

F : Female / Femelle.

percentage of dominant lethals induced was directly dependent on the concentrations used. In the present investigation there is no significant reduction in fecundity of *B. mori* L. with NEU. Similar results were reported by Tazima (1964) who found no appreciable changes in the fecundity of silkworms even after treatment with 3000r at pupal stage.

Table II. ANOVA summary table for the effect of NEU on the induction of dominant lethals in the F₁ generation of *B. mori* L.

Tableau II. Résumé de l'analyse de variance de l'effet du N-nitroso-N-éthylurée (NEU) sur l'induction de mutants létaux dominants dans la génération F₁ chez *B. mori* L.

Characters	Source of variation	Degree of freedom	F-ratio	Critical F (at 0.05)	Probability
Caractères	Source de variation	Degré de liberté	Rapport de F	Seuil de F (à 0,05)	Probabilité
% dominant lethals	BC	3	44.50	4.76	0.001
Létaux dominants (%)	BD	2	5.84	5.14	0.05
Fecundity	BC	3	2.86	4.76	NS
Fécondité	BD	2	0.83	5.14	NS
% unhatched eggs	BC	3	45.47	4.76	0.001
Oeufs non éclos (%)	BD	2	6.59	5.14	0.05

BC : Between crosses / Entre les croisements.

BD : Between doses / Entre les doses.

NS : Not significant / Non significatif.

REFERENCES

- AHMED F. (1980) Studies on the effect of the quality of mulberry leaves on the growth, development and cocoon yields of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). Unpublished Microthesis, Dept. of Zoology, Rajshahi Univ., 63 pp.
- ARMSTRONG J.B., FLATCHER W. (1983) Assessment of mutagenic damage following ethyl methanesulphonate mutagenesis in Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. J. Expt. Zool., 266, 330-340.
- ASLANIYAN M.M., SMIRNOVA V.A. (1981) Analysis of mutations by alkylating agents in *Drosophila* spermatozoa. II. The nature of chemically induced unstable mutations in *Drosophila melanogaster*. Genetika, 17, 684-693.
- BERNETT L. (1963) The wonders of life on earth. Prentice and Hall Int., 48 pp.
- BREWEN J.G., PAYNE H.S., JONES K.P., PRESTON R.J. (1975) Studies on chemically induced dominant lethality. I. The cytogenic basis of MMS-induced dominant lethality in post-meiotic male germ cells. Mutat. Res., 33, 239-250.
- CORWIN H.O. (1968) The mutagenic effect of N-nitrosomethylurea on the dumpy locus in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res., 5(2), 259-270.
- DATTA R.K., ROY G.C. (1976) X-ray induced mutagenesis in silkworm. Ann. Res. and Admn. Report, Sericultural Res. Inst. Berhampore, India, 11-17.
- DATTA R.K., SENGUPTA K., DAS S.K. (1978) Induction of dominant lethals with ethyl methanesulphonate in germ cells of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Mutat. Res., 56, 299-304.
- GAUR J.P., MEHROTRA P.N. (1986) Effects of various chemicals on germs cells of *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera) the wild tasar silkworm. Sericologia 26(3), 275-280.
- GENEROSO W.M., RUSSELL W.L., HUFF S.W., STOUT S.K., GOSSLEE D.G. (1974) Effect of dose on the induction of dominant lethal mutations and heritable translocations with ethyl methane sulphonate in male mice. Genetics, 77, 741-752.

- IKEBUCHI M., NAKAO Y. (1979) Storage effects on translocations and dominant lethals induced by ethyl methanesulfonate in *Drosophila melanogaster*. Japan J. Genet., 54, 133-137.
- KERIMOVA I.O. (1978) Mutagenic effect of dimethylsulfonate and N-nitrosoethylurea on the silkworm, *Bombyx mori* L. Genetika, 14(1), 62-67.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Central Silk Board, India, 23 pp.
- LANG R., ADLER I.E. (1977) Heritable translocation test and dominant lethal assay in male mice with MMS. Mutat. Res., 48, 75-88.
- LEE W.R. (1978) Dosimetry of chemical mutagens in eukaryote germ cells. In Chemical mutagenesis. Hollaender A. and de Serres F.J. (Eds), 177-202.
- MURAKAMI A. (1973) Acridine orange mutagenesis in silkworm. Japan J. Genet., 47, 331-334.
- MURAKAMI A. (1975) Mutagenicity of diethyl sulphate in spermatozoa of the silkworm. I. Delayed mutagenic effect. Ann. Rep. Natl. Genet., 25, 42.
- MURAKAMI A. (1985) A new mutant at the *pe*⁺ locus, black eyed light yellowish-brown egg in the silkworm, *Bombyx mori*. Sericologia 25(3), 327-334.
- MUROTA T., MURAKAMI A. (1977) Inductions of dominant lethal mutations by alkylating agents in germ-cells of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 46, 205-212.
- PAI I.K., HEGDE S.N., KRISHNAMURTHY N.B. (1985) Dominant lethals induced by Apron 35 SD in silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 25(3), 343-345.
- PROUST J.P., SANKARNARYANAN K., SOBELS F.H. (1972) The effect of treating *Drosophila* females with actinomycin-D on the yields of dominant lethals recovered from X-ray irradiated spermatozoa. Mutat. Res., 16(1), 65-67.
- RAHMAN M., KHAN A.R. (1975) Effect of different types of mulberry leaves on the weight of silkworm larvae *Bombyx mori* L., race Nistari D/44 (non-spotted). Bangladesh J. Zool., 3(1), 121-124.
- RUSSELL L.B., MONTGOMERY O.S. (1982) Supermutagenicity of ethyl nitrosourea in the mouse spot test. Mutat. Res., 72, 193-204.
- RYO H., ITO K., KOHDO S. (1981) Increment kinetics of recessive lethal mutations and dominant lethals in offsprings of *Drosophila melanogaster* on storage of methyl methanesulphonate treated sperm in females. Mutat. Res., 83, 179-190.
- SALAM M.A. (1984a) Modification of N-nitroso-N-ethylurea-induced sex-linked recessive lethal frequency by butylated hydroxytoluene in *Drosophila melanogaster*. Univ. J. Zool., Rajshahi Univ., 3, 13-18.
- SALAM M.A. (1984b) A storage effect of N-nitroso-N-ethylurea on the induction of dominant sex-linked recessive lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. Univ. J. Zool., Rajshahi Univ., 3, 19-25.
- SEGA G.A., OWENS J.G. (1983) Methylation of DNA and protamine by methylsulfonate in the germ cells of male mice. Mutat. Res., 111, 227-244.
- SELEZNEV Y.V. (1976) Combined effect of N-nitro-N-ethylurea and actinomycin-D on Chinese hamster chromosomes. Genetika, 12(3), 66-68.
- TAZIMA Y. (1964) The genetics of silkworm. Elek. Books Ltd., London, 253 pp.
- TAZIMA Y., ONIMARA K. (1968) Mutagenic action of mitomycin-C and EMS on premeiotic germ cells of the male silkworm. Ann. Rep. Inst. Genet. (Japan), 19, 62-63.
- VOGEL E., LEIGH B. (1975) Concentration effect studies with MMS, TEB, 2,4,6-TriCL-PDMT and DEN on the induction of dominant and recessive lethals, chromosome loss and translocation in *Drosophila* sperm. Mutat. Res., 29, 363-396.
- VOGEL E., NATARAJAN A.T. (1979) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila*. Mutat. Res., 62, 51-100.

EFFET DU N-NITROSO-N-ETHYLUREE SUR L'INDUCTION DE MUTATIONS LETALES CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

M. ABDUS SALAM, M. SAIFUL ISLAM, S. MAHFUZAR RAHMAN & M. NAZMUL HAQUE

Department of Zoology, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh.

On a étudié l'effet de 3 doses de N-nitroso-N-éthylurée (NEU), soit 20 mg, 25 mg et 30 mg, sur l'induction de mutations dominantes létales chez la souche Nistari C/40 de *Bombyx mori* L. Cette substance a un effet significatif ($P < 0,05$) sur l'induction de mutations dominantes létales et on observe une relation linéaire entre les doses et la fréquence des mutants létaux. Bien que le mutagène ne réduise pas la fécondité de manière significative chez *Bombyx mori*, on note une augmentation significative ($P < 0,05$) du pourcentage d'oeufs non éclos après le traitement.

INTRODUCTION

Le ver à soie du mûrier *Bombyx mori* est la principale source de soie naturelle et sur presque 1 000 races de vers à soie (Bernett, 1963), seules quelques races, comprenant différentes souches de Nistari et de Nistid ainsi qu'un ou deux hybrides, sont élevées au Bangladesh. Diverses tentatives ont été réalisées pour améliorer la production de soie chez la race indigène Nistari, souche à faible rendement en soie. Rahman et Khan (1975) ont étudié l'effet du nourrissage de *B. mori* avec différents types de feuilles de mûriers et Ahmed (1980) a observé les effets du nourrissage en fonction de l'heure de récolte des feuilles. Datta et Roy (1976) ont tenté d'améliorer cette race par la sélection, mais cette tentative s'est révélée vaine du fait de l'homogénéité génétique de cette souche entraînant une réaction négative à la sélection. Les traits quantitatifs étant gouvernés par des polygènes, il paraît possible de créer une variabilité génétique au sein du pool des gènes par application de mutagènes à différents âges de cette race domestique. Des études antérieures sur la production de mutations létales dominantes chez *Drosophila melanogaster* (Ikebuchi et Nakao, 1979 ; Salam, 1984a) et sur l'induction de mutations létales récessives (Vogel et Leigh, 1975) ont démontré que des alkylants monofonctionnels sont capables d'exercer des effets mutagènes. Des études réalisées sur le hamster chinois (Seleznev, 1976), le ver à soie (Murakami, 1973, 1987 ; Murota et Murakami, 1977 ; Datta et coll., 1978 ; Kerimova, 1978 ; Tazima et Onimara, 1968), la souris (Russel et Montgomery, 1982 ; Sega et Owens, 1983) et *Ambystoma* (Armstrong et Fletcher, 1983) ont révélé que l'application d'agents de ce type permettait d'induire une mutagenèse chez un grand nombre d'organismes. Récemment, Pai et coll. (1985) et Gaur et Mehrotra (1986) ont observé les effets de l'Apron 35 SD et du sulphonate de méthane éthylique respectivement sur le ver à soie du mûrier et sur le ver à soie tassar sauvage. Murakami (1985) a également induit une mutation chez *Bombyx mori* par traitement à l'aflatoxine B₁. La présente étude vise à évaluer l'effet du NEU sur l'induction de mutations létales dominantes chez le ver à soie du mûrier *B. mori* L.

MATERIELS ET METHODES

La race Nistari C/40, souche polyvoltine standard de *Bombyx mori* L., dont les oeufs ont été fournis par la banque génétique de vers à soie du Bangladesh Sericulture Research and Training

Institute, Rajshahi, a été choisie pour cette étude. La technique conventionnelle d'élevage (Krishnaswami, 1978) a été suivie pendant toute la durée de l'expérience. Les oeufs ont été incubés à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et à $80 \pm 5\%$ d'humidité relative. Pour l'estimation des mutations létales dominantes, les expériences ont été répétées 8 fois pour chaque lignée non traitée (témoin) et traitée avec du NEU. L'expérience a été conduite de la génération parentale à la génération F_1 , cette dernière comportant trois croisements sélectifs pour chaque dose. Trois doses du mutagène ont été préparées, soit 20, 25 et 30 mg de NEU pour 1 ml d'eau distillée. Au cours du traitement, 1 ml de solution de NEU est prélevé à l'aide d'un verre de montre et conservé dans un dessiccateur hermétique pendant 12 heures à 25°C . L'estimation de la létalité dominante est réalisée d'après la formule suivante (Proust et coll., 1972) :

$$P_x = \frac{P_1 - P_c}{100 - P_c} \times 100$$

où :

P_x = létaux dominants,

P_1 = pourcentage d'oeufs non éclos chez la lignée traitée,

P_c = pourcentage d'oeufs non éclos chez la lignée non traitée.

Le nombre total d'oeufs pondus par femelle donne la fécondité, tandis que le pourcentage d'oeufs non éclos est calculé d'après le nombre total d'oeufs bleus, morts et non fécondés pour chaque répétition.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans le tableau I indiquent que l'induction de létaux dominants aussi bien chez les parents que chez la génération F_1 augmente en même temps que les doses de NEU. Des résultats similaires ont également été observés pour les différents croisements sélectifs entre les lots traités et témoins et entre mâle et femelles. Bien que ce ne soit pas significatif, le mutagène tend à réduire la fécondité chez *B. mori* L. Le pourcentage d'oeufs non éclos augmente à mesure que les concentrations de mutagène augmentent.

Les analyses statistiques des données obtenues à la génération F_1 (Tableau II) montrent que les traitements au NEU entraînent des augmentations significatives de létaux dominants ($P < 0,05$) et d'oeufs non éclos ($P < 0,05$). Les létaux dominants et le pourcentage d'oeufs non éclos obtenus par croisements sélectifs sont également fortement significatifs ($P < 0,001$).

Bien que l'on utilise près de 3,5 millions de substances chimiques dans le monde, très peu d'études systématiques ont été faites en utilisant *B. mori* comme modèle. Les études d'Aslaniyan et Smimova (1981) ont permis de démontrer que le NEU est un alkylant monofonctionnel sur-mutagène, capable de produire un spectre bien défini d'attaques des groupements éthyles dans l'ADN des cellules traitées. Des études antérieures (Genoroso et coll., 1974 ; Brewen et coll., 1975 ; Lang et Adler, 1977) ont montré que les mutations létales dominantes sont généralement produites par de petites délétions, des ruptures chromosomiques et des translocations. Dans la présente étude, on observe une relation linéaire entre l'augmentation de la concentration en NEU et l'augmentation de l'induction de létaux dominants. Ces résultats sont conformes à ceux de Corwin (1968), Lee (1978) et Ryo et coll. (1981) qui ont utilisé respectivement le N-nitrosométhylurée et le sulphonate d'éthyl-méthane chez *D. melanogaster*. Nos résultats corroborent également ceux de Pai et coll. (1985) qui ont démontré, en utilisant l'Apron 35 SD sur le ver à soie, que le pourcentage de létaux dominants dépend directement des concentrations utilisées. Dans notre étude, le NEU n'entraîne pas de diminution significative de la fécondité de *B. mori* L. Des résultats identiques ont été relevés par Tazima (1964) qui n'a pas distingué de changement sensible de la fécondité des vers à soie même après traitement avec 3000r au stade pupal.

SENSILLA STYLOCONICA ON THE MAXILLARY LOBE OF *BOMBYX MORI* AND *SPODOPTERA LITURA*

T. HIRAO*, N. ARAI*, T. SHIMIZU** & M. YAZAWA**¹

* National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

** Department of Insect Physiology and Behavior, National Institute of Sericulture and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

*The structure and sensory physiology of sensilla styloconica-I and -II on the maxillary lobe of three lepidopterous insects are discussed. External morphology of the sensilla styloconica, sensilla trichodea and sensillum chaeticum on the maxillary palpus in the three lepidopterous insects is very similar, except for the small number of small structures such as Ss-III. The electrophysiological responses of Ss-I and -II from two phytophagous lepidopterous insects, *Bombyx mori* and *Spodoptera litura*, however, showed differences in localization of receptors sensitive to sugar and bitter substances.*

Keywords : Sensilla styloconica, maxillary lobe, *Bombyx mori*, *Malacosoma neustria*, *Hyphantria cunea*.

INTRODUCTION

There are six hairs on the maxillary lobe (Detheir, 1937) of lepidopterous larvae, and it is well known that the sensilla styloconica on the maxilla function as chemosensory organs. Schoonhoven (1969, 1987) has reviewed the receptor modalities of the maxillary sensilla styloconica of some lepidopterous larvae. Here, we report some microstructural differences in the sensilla styloconica and the presence of different chemoreceptors in the sensilla of some lepidopterous species.

MATERIALS AND METHODS

Insects :

Four lepidopterous species, i.e. *Bombyx mori*, *Malacosoma neustria*, *Hyphantria cunea* and *Spodoptera litura*, were used in the present experiments. They were reared on plant leaves, and newly molted last instar larvae were used.

Scanning electron microscope (SEM) :

JSM-U3 scanning electron microscope (SEM) (Japan electronic microscope : JEM, Japan) at an accelerating high voltage of 40 KV was used. Preparation of the samples was done according to the standard techniques.

1. To whom correspondence should be addressed.

RESULTS AND DISCUSSION

The maxillary consists of the maxillary palpus and the maxillary lobe. There are three sensilla styloconica, two sensilla trichodea and a single sensillum chaeticum on the maxillary lobe (Fig. 1). Among these sensilla we can obtain electrical responses from the sensilla styloconica when stimulated by gustatory substances, but no electrical responses can be recorded from the Ss-III (indicated with an asterisk in Fig. 1) of *B. mori* (classification by Ishikawa and Hirao, 1963), representing very small styloconica or degenerated styloconica. In *B. mori* this Ss-III is located between Ss-I and Ss-II. In the case of *H. cunea* there are three similar small-type sensilla styloconica; one located near Ss-I and the other two near Ss-II. In *M. neustria*, one Ss-III is found close to Ss-I and another near Ss-II (Fig. 1 and Table I). The external structure of the sensilla styloconica, sensilla trichodea and sensilla chaetica on the maxillary palpus in these three lepidopterous insects appears very similar, except for size differences such as the small Ss-III.

Table I. The number of hairs on the maxillary lobe of three phytophagous lepidopterous insects.

Tableau I. Nombre de soies sur le lobe maxillaire chez trois lépidoptères phytophages.

Species	Hairs on the maxillary lobe	Sensilla styloconica*	Sensilla trichodea	Sensillum chaeticum
Espèces	Soies sur le lobe maxillaire	Sensilles styloconiques*	Sensilles trichodées	Sensille chaetique
<i>B. mori</i>	6	2 (+ 1)	2	1
<i>H. cunea</i>	8	2 (+ 3)	2	1
<i>M. neustria</i>	7	2 (+ 2)	2	1

* Numbers in parentheses indicate styloconic hairs which are too small for recording receptor activities (indicated with asterisks in Fig. 1).

* Les chiffres entre parenthèses indiquent les soies styloconiques pour lesquelles on n'a pas pu enregistrer les activités du récepteur du fait de leur trop petite taille (indiquées par des astérisques dans la figure 1).

In Table II, the electrophysiological responses from the Ss-I and -II in two lepidopterous insects are listed, based on our previous data (Ishikawa and Hirao, 1963; Ishikawa, 1966; Hirao and Arai, 1990). Fructose elicits responses in the Ss-I (lateral) and -II (medial sensillum) of *Spodoptera litura*, but in *Bombyx* only the Ss-I responds to this compound. In *S. litura*, responses to bitter substances are only obtained from Ss-I, whereas Ss-II appears insensitive. In *B. mori*, on the contrary, bitter substances stimulate Ss-II. Interestingly, sinigrin elicits responses from the R receptor in *S. litura*, but not from the R receptor in *B. mori*. Contrarily, salicin induces responses in the R receptor of *B. mori*, but not in *S. litura*. Responses to water are found in Ss-I of *S. litura*, but in the case of *B. mori* Ss-II appears to react to water. It should be added that even when we are dealing with similar receptors, the sensitivity of the receptors to the same gustatory stimulus differs between *S. litura* and *B. mori* (Hirao and Arai, in preparation). Most recently, Simmonds *et al.* (1992) have reported the effects of larval diet and larval age on the responsiveness of taste neurones of *S. littoralis* to sucrose, showing that the sensitivity of a receptor should not be regarded as a fixed or constant character.

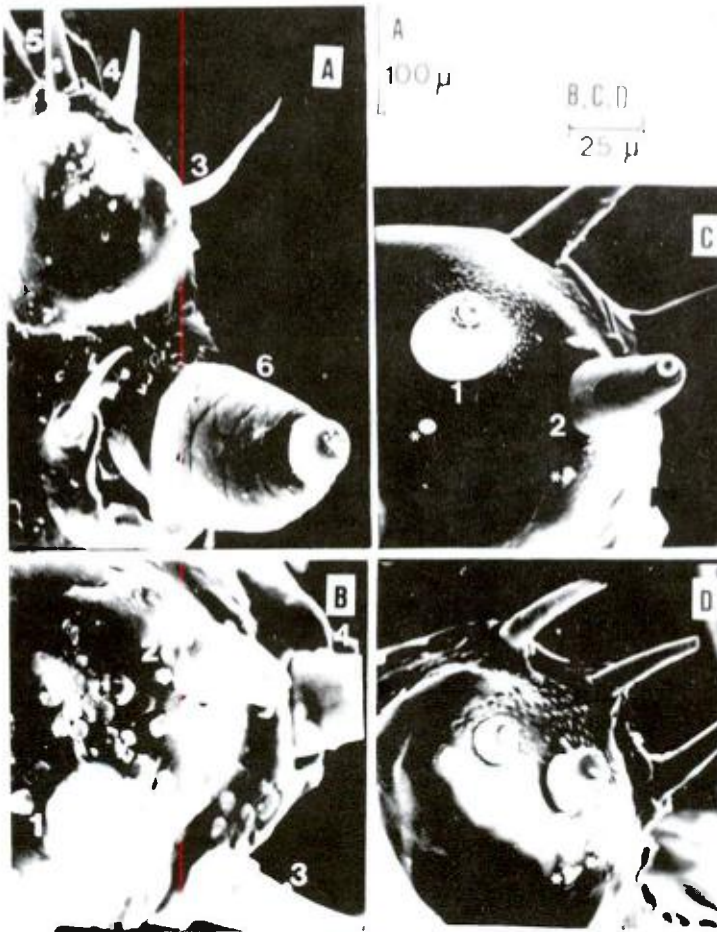


Fig. 1 : Comparative view of sensilla styloconica-I and -II on the maxillary lobe in the larvae of three insect species.

A : Maxillary lobe of *Bombyx mori*. **B :** Sensilla styloconica-I and II on the maxillary lobe of *Bombyx mori*. **C :** Sensilla styloconica-I and II on the maxillary lobe of *Malacosoma neustria*. **D :** Sensilla styloconica-I and II on the maxillary lobe of *Hyphantria cunea*.

1, 2 : Sensilla styloconica. **3, 4 :** Sensilla trichodea. **5 :** Sensillum chaeticum. **6 :** Maxillary palpus.

1 : Lateral sensillum (L)-Ss-I. **2 :** Medial sensillum (M)-Ss-II.

Fig. 1 : Vue comparative des sensilles styloconiques-I et -II sur le lobe maxillaire des larves de trois espèces d'insectes.

A : Lobe maxillaire de *Bombyx mori*. **B :** Sensilles styloconiques-I et II sur le lobe maxillaire de *Bombyx mori*. **C :** Sensilles styloconiques-I et II sur le lobe maxillaire de *Malacosoma neustria*. **D :** Sensilles styloconiques-I et II sur le lobe maxillaire de *Hyphantria cunea*.

1, 2 : Sensilles styloconiques. **3, 4 :** Sensilles trichodées. **5 :** Sensille chaétique. **6 :** Palpe maxillaire.

1 : Sensille latérale (L)-Ss-I. **2 :** Sensille médiane (M)-Ss-II.

Table II. Response of sensilla styloconica-I and -II of *Bombyx mori* and *Spodoptera litura* to gustatory substances*.Tableau II. Réponses des sensilles styloconiques I et II de *Bombyx mori* et de *Spodoptera litura* aux substances gustatives.

Maxillary lobe	Receptor	Gustatory substances	Reference
<i>Lobe maxillaire</i>	<i>Récepteur</i>	<i>Substances gustatives</i>	<i>Référence</i>
<i>Bombyx mori</i>	N1 (salt)	NaCl, CaCl ₂ , KCl	1)
Sensilla styloconica-I	Ls (sugar)	sucrose, maltose, D-fructose, methyl- α -D-galactose, D-glucose, D-arabinose, L-rhamnose, D-xylose, D-ribose	
Sensilles styloconiques-I	Ls (<i>sucré</i>)	L-arabinose, D-mannose, D-galactose, trehalose, raffinose, melezitose, lactose, cellobiose, melibiose, methyl- α -D-mannoside, dulcitol, mannitol, sorbitol	1)
Ss-I	G	D-glucose	1)
	LI	inositol	1)
	X	L-isoleucine, L-leucine	2)
Sensilla styloconica-II	N2 (salt)	NaCl, CaCl ₂ , KCl	1)
Sensilles styloconiques-II	N2' (<i>sel</i>)	NaCl, CaCl ₂ , KCl	1)
Ss-II	R (bitter)	strychnine nitrate / <i>nitrate de strychnine</i> , salicin, brucine, phlorizin, quinine	
	R (<i>amer</i>)	pilocarpine hydrochloride / <i>chlorure de pilocarpine</i> , berberine hydrochloride / <i>chlorure de berbérine</i> , rutin, nicotine, choline chloride / <i>chlorure de choline</i> , hydrochloride / <i>hydrochlorure</i> , amygdaline, sulphate, L-leucine, L-tryptophan, L-histidine-HCl · H ₂ O, L-arginine	
	W	L-lysine-HCl water / <i>eau</i>	3)
<i>Spodoptera litura</i>	N1	NaCl, CaCl ₂ , KCl	4)
Sensilla styloconica-I	SI	sucrose, fructose, glucose	4)
Sensilles styloconiques-I	R	sinigrin, phloridzin, amygdaline, methionin	
(Ss-I)	W	water / <i>eau</i>	4)
Sensilla styloconica-II	N2	NaCl, CaCl ₂ , KCl	4)
Sensilles styloconiques-II	N2'	NaCl, CaCl ₂ , KCl	4)
(Ss-II)	S2	fructose	4)
	I	inositol	4)

* The electrophysiological response was obtained from Ss-I and -II of unfed fifth instar larvae of *B. mori* and *S. litura*.

The electrophysiological methods used in the experiments were the same as described previously (Ishikawa, 1963). All gustatory substances were of analytical reagent grade.

* La réponse électrophysiologique a été obtenue à partir de Ss-I et Ss-II de larves du cinquième âge à jeun de *B. mori* et de *S. litura*.

Les méthodes électrophysiologiques utilisées dans ces expériences sont identiques aux méthodes décrites précédemment (Ishikawa, 1963). Toutes les substances gustatives sont de qualité analytique.

1) Ishikawa S., Hirao T. (1963) Bull. Sericult. Exp. Sta., 18, 297-357.

2) Ishikawa S. (1966) J. Cell. Comp. Physiol., 67, 1-11.

3) Hirao T., Arai N. (1990) Japan J. Appl. Ent. Zool., 34, 73-76.

4) Hirao T., Arai N. (1993) Japan J. Appl. Ent. Zool. (in preparation).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Schoonhoven, L.M., Agricultural University, Wageningen, for his critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- DETHIER V.G. (1937) Gustation and olfaction in lepidopterous larvae. *Biol. Bull.*, 72, 7-23.
- HIRAO T., ARAI N. (1990) Gustatory and feeding responses to amino acid in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Japan J. Appl. Ent. Zool.*, 34, 73-76.
- ISHIKAWA S. (1963) Responses of maxillary chemoreceptors in the larva of the silkworm, *Bombyx mori*, to stimulation by carbohydrates. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 61, 99-107.
- ISHIKAWA S. (1966) Electrical response and function of a bitter substance receptor associated with the maxillary sensilla of the larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 67, 1-11.
- ISHIKAWA S., HIRAO T. (1963) Electrophysiological studies of taste sensation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 18, 297-357.
- SCHOONHOVEN L.M. (1969) Gustation and foodplant selection in some lepidopterous larvae. *Entomol. Exp. Appl.*, 12, 555-564.
- SCHOONHOVEN L.M. (1987) What makes a caterpillar eat ? The sensory code underlying feeding behavior. *In Perspectives in chemoreception and behavior*, Eds. R.F. Chapman, E.A. Bernays, J.G. Stoffolano Jr, Springer, London, 69-97.
- SIMMONDS M.S.J., BLANEY W.M., SCHOONHOVEN L.M. (1992) Effects of larval diet and larval age on the responsiveness of taste neurones of *Spodoptera littoralis* to sucrose. *J. Insect Physiol.*, 38, 249-257.

SENSILLES STYLOCONIQUES DU LOBE MAXILLAIRE DE *BOMBYX MORI* ET DE *SPODOPTERA LITURA*

T. HIRAO*, N. ARAI*, T. SHIMIZU** & M. YAZAWA**

* National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japon.

** Department of Insect Physiology and Behavior, National Institute of Sericulture and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japon.

*La structure et la physiologie sensorielle des sensilles styloconiques-I et -II sur le lobe maxillaire de trois lépidoptères sont étudiées. La morphologie externe des sensilles styloconiques, des sensilles trichodées et de la sensille chaetique sur le palpe maxillaire est tout à fait analogue chez les trois lépidoptères, sauf pour un petit nombre de petites structures comme Ss-III. Cependant, les réponses électrophysiologiques de Ss-I et Ss-II de deux lépidoptères phytophages, *Bombyx mori* et *Spodoptera litura*, présentent des différences de localisation des récepteurs sensibles au sucre et aux substances amères.*

INTRODUCTION

Il y a six poils sur le lobe maxillaire des larves de lépidoptères (Detheir, 1937) et on sait que les sensilles styloconiques des machoires servent d'organes chimiosensoriels. Schoonhoven (1969, 1987) a écrit une revue sur les récepteurs des sensilles styloconiques maxillaires de certaines larves de lépidoptères. Nous décrivons ici certaines différences microstructurelles chez les sensilles styloconiques et la présence de différents chimiorécepteurs dans les sensilles de certaines espèces de lépidoptères.

MATERIELS ET METHODES

Insectes :

Quatre espèces de lépidoptères, c'est-à-dire *Bombyx mori*, *Malacosoma neustria*, *Hyphantria cunea* et *Spodoptera litura*, ont été choisies pour cette expérience. Elles ont été élevées avec des feuilles de végétaux et les larves du dernier âge en sortie de mue ont été utilisées.

Microscope électronique à balayage (SEM) :

On a utilisé le microscope à balayage électronique (SEM) JSM-U3 (Japan electronic microscope : JEM, Japon) à 40 KV. La préparation des échantillons a été effectuée selon les techniques standards.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le maxillaire comprend le palpe maxillaire et le lobe maxillaire. Il y a deux sensilles styloconiques, deux sensilles trichodées et une seule sensille chaetique sur le lobe maxillaire (Fig. 1). Parmi ces sensilles, on peut obtenir des réponses électriques des sensilles styloconiques lorsqu'elles sont stimulées par des substances gustatives, mais aucune réponse électrique n'est enregistrée chez Ss-III (indiquée par une astérisque dans la Fig. 1) de *Bombyx mori* (classification réalisée par Ishikawa

et Hirao, 1963), représentant de très petites styloconiques et des styloconiques dégénérées. Chez *B. mori*, cette Ss-III se situe entre Ss-I et Ss-II. Dans le cas de *H. cunea*, on observe trois petites sensilles styloconiques du même type : l'une est située près de Ss-I et les deux autres près de Ss-II. Chez *M. neustria*, une sensille Ss-III se situe près de Ss-I et une autre près de Ss-II (Fig. 1 et Tableau I). La structure externe des sensilles styloconiques, des sensilles trichodées et des sensilles chaetiques sur le palpe maxillaire semble analogue chez ces trois lépidoptères, mis à part des différences de taille pour les petites Ss-III.

Le tableau II présente la liste des réponses électrophysiologiques de Ss-I et Ss-II chez deux lépidoptères classées en fonction de données obtenues précédemment (Ishikawa et Hirao, 1963 ; Ishikawa, 1966 ; Hirao et Arai, 1990). Le fructose induit des réactions chez Ss-I (latérale) et Ss-II (sensille médiane) de *Spodoptera litura* ; cependant, chez *Bombyx*, seule Ss-I réagit à ce composé. Chez *S. litura*, seule Ss-I donne des réponses aux substances amères tandis que Ss-II semble insensible. A l'inverse, chez *B. mori*, les substances amères stimulent Ss-II. Il est intéressant de noter que la sinigrine induit des réponses chez le récepteur R de *S. litura* mais pas chez celui de *B. mori*. A l'inverse, la salicine induit des réponses chez le récepteur R de *B. mori* mais pas dans celui de *S. litura*. On observe des réponses à l'eau chez la Ss-I de *S. litura* ; cependant, dans le cas de *B. mori*, Ss-II semble réagir à l'eau. Il faut également noter que même lorsqu'il s'agit de récepteurs identiques, leur sensibilité à un même stimulus gustatif diffère entre *S. litura* et *B. mori* (Hirao et Arai, en préparation). Très récemment, Simmonds et coll. (1992) ont observé les effets de l'alimentation des larves et de l'âge larvaire sur la sensibilité des neurones du goût de *S. littoralis* au sucrose et démontré qu'il ne faut pas considérer la sensibilité d'un récepteur comme un caractère fixe ou constant.

STUDIES ON THE EFFECT OF ASCORBIC ACID (VITAMIN C) ON THE FECUNDITY IN THE MULBERRY SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.)

T.P S CHAUHAN & KAMALA SINGH

Regional Sericultural Research Station, Majra, Dahradun - 248 171, India.

Ascorbic acid (vitamin C) enhances the egg laying capacity of the female mulberry silkworm when fed to silkworm larvae at 10 % concentration in later stages (III, IV and V instars) in the form of an aqueous solution sprayed on mulberry leaves. At lower concentration, it does not have any marked influence either on larval health or fecundity in moths. Feeding of ascorbic acid from early stages (I and II stages) does not appear to have any effect on fecundity.

Keywords : Monophagous, *Morus*, phagostimulating, gonad, metabolic, oviposition, fecundity, *Antheraea polyphemus*.

INTRODUCTION

The mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) is strictly monophagous and the mulberry (*Morus* spp.) is the only food plant it feeds on. The quality of mulberry leaves fed to the silkworm thus contributes maximum towards the health, growth of silkworms and quality of silk cocoons produced by them.

Extensive studies have been made on the nutritional requirement of silkworms. The perfection has reached the level of synthetic diet with or without mulberry leaves.

Proteins, vitamins, carbohydrates, lipids and minerals and their effect on the health and vigour of silkworm larvae have been studied by several workers. Caro and Rovita (1939) traced the presence of vitamin C (ascorbic acid) in the mulberry leaf. Sengupta *et al.* (1972) studied the effect of amino acids, sugar, vitamins on the health of silkworms. Murthy (1953) studied the nutritional values of vitamins for silkworms. Ito (1961a, 1961b) observed the feeding stimulant action of ascorbic acid when added to synthetic diet in later larval stages. Ito and Arai (1965) confirmed that ascorbic acid is not synthesised in the body of silkworms. Thorsteinson (1958) has earlier studied the phagostimulating effect of ascorbic acid in several insect species. Similar observations have been made by Dadd (1957, 1960a, 1960b) in respect of two species of locusts.

Relation between feeding and egg production in some species of insects during larval and adult stages has been studied by Muthukrishnan and Pandian (1987) and several other workers earlier. Ito (1961a, 1961b) and Ito and Arai (1965) found vitamins influencing the silkworm physiology and maturation of gonads. However, only fragmentary references are available showing the influence of vitamins (ascorbic acid) on fecundity. The present study by the authors is an attempt to find out the effect of ascorbic acid on fecundity when fed to silkworms in different larval stages.

MATERIALS AND METHODS

JD6, one of the most popular bivoltine races of Regional Sericultural Research Station (Majra, Dehradun), was selected as experimental material for the study. The silkworm larvae of the above race both in treated and control batches were fed with mulberry leaves from S146 variety of

Berhampore (West Bengal) origin now extensively grown in the region, throughout the studies. The normal rearing procedures as recommended by Yokoyama (1962), Tanaka (1964) and Anonymous (1980) have been followed uniformly in respect of all experimental and control batches.

In the preliminary investigations, ascorbic acid in aqueous solution in three concentration, viz. 5, 10 and 15 %, was sprayed on freshly plucked mulberry leaves in fine mist with the help of an atomiser. The leaves were dried at room temperature before feeding to the silkworm larvae in the three different batches as per the experimental details from the third to the fifth larval stages, when metabolic activities and protein synthesis are higher. Normal leaves were fed to the worms in the control batches after spraying them with water and drying.

After completion of the rearing, the cocoons in the different treatments were harvested and cut open. The pupae were sexed on the basis of pupal sex markings and weighed individually. The pupae with a similar weight range were preserved in empty cocoon shells for emergence in batches.

On emergence, female moths in the different treatment batches were allowed to mate with the males of the same batch for about four hours. The male moths were used only once. The eggs laid by individual female moths in the first 1.5 days or till completion of the oviposition were recorded.

On the basis of the observations made and data recorded during preliminary investigations, studies on the effect of ascorbic acid at 10 % concentration were pursued further with precisely the same details and procedures to find out the effect of feeding ascorbic acid in different larval stages as per the following details :

- T1 : Treated leaves fed from 1st to 5th instar.
- T2 : Treated leaves fed from 2nd to 5th instar.
- T3 : Treated leaves fed from 3rd to 5th instar.
- T4 : Treated leaves fed from 4th to 5th instar.
- T5 : Treated leaves fed in 1st instar only.
- T6 : Treated leaves fed in 2nd instar only.
- T7 : Treated leaves fed in 3rd instar only.
- T8 : Treated leaves fed in 4th instar only.
- T9 : Treated leaves fed in 5th instar only.

The silkworm larvae fed with 10 % aqueous ascorbic acid solutions were divided in several groups for breeding and grainage operations. The significance in the experimental data was calculated by Student's 't' test.

RESULTS AND DISCUSSION

During the course of the first phase of experiment, three concentrations, viz. 5 %, 10 % and 15 %, of ascorbic acid in the form of aqueous solution were sprayed on mulberry leaves and the enriched leaves were fed to the larvae from III to V stages in three different batches. The silkworm batches fed with 10 % ascorbic acid were found to exhibit not only a marked improvement in the larval health but fecundity also improved significantly compared to the batches fed with 5 % and control. The 15 % concentration of ascorbic acid did not show any significant increase in fecundity over the 10 % concentration (Table I).

Ascorbic acid at 10 % concentration appeared to be the optimum dose for significant improvement in fecundity.

It has been further observed that mulberry leaves fortified with 10 % ascorbic acid does not show a marked influence on fecundity when fed from early stages (T1, T2) compared to the batches fed with treated leaves from 3rd to 5th stages (T3, T4). It is clear that larvae in advanced stages with enhanced metabolic activities are more responsive to the treatment (Table II).

Table I. Effect of ascorbic acid in different concentrations on fecundity in the silkworm (*B. mori* L.).

Tableau I. Effet de l'acide ascorbique à différentes concentrations sur la fécondité chez le ver à soie (B. mori L.).

	Fecundity at			Control
	5 % dietary ascorbic acid	10 % dietary ascorbic acid	15 % dietary ascorbic acid	
	<i>Fécondité à</i>			<i>Témoin</i>
	<i>acide ascorbique à 5 %</i>	<i>acide ascorbique à 10 %</i>	<i>acide ascorbique à 15 %</i>	
	370	463	505	437
	496	474	501	346
	423	500	504	445
	470	480	441	373
	389	426	449	296
	506	493	464	313
Average $\bar{X} / \bar{X}$ moyen	442	473	477	368
$\bar{X}$		440		
N = 24	EX = 10564			

Analysis of variance / Analyse de variance :

Sequence of variation	Sum of square of deviation	Degree of freedom	Variance
<i>Variation</i>	<i>Somme des carrés des écarts</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Variance</i>
Between treatments <i>Entre les traitements</i>	45876	(4-1) = 3	45876/3 = 15292
Within treatments <i>A l'intérieur des traitements</i>	43349	(24-4) = 20	43349/20 = 2167.45

$$F^* = \frac{\text{Greater variance / Variance supérieure}}{\text{Smaller variance / Variance inférieure}} = \frac{15292}{2167.45} = 7.055$$

* (< 4.94) 1 %, (< 3.10) 5 %

Table II. Effect of ascorbic acid on fecundity in the silkworm (*B. mori* L.).Tableau II. Effet de l'acide ascorbique sur la fécondité chez le ver à soie (*B. mori* L.).

Treatments	Number of unfertilised eggs	Number of fertilised eggs	Total eggs
Traitements	Nombre d'oeufs non fertilisés	Nombre d'oeufs fertilisés	Total d'oeufs
T1	10	550	560
	23	467	490
	-	550	550
	32	456	488
	33	557	590
	10	563	573
	04	596	600
	10	654	664
	15.25	549 ± 64.22	564 ± 57.96
T2	05	564	569
	02	548	550
	16	514	530
	06	489	495
	08	582	590
	04	471	475
	09	668	677
	08	693	701
	7.25	566 ± 79.96	573 ± 75.47
T3	05	676	681
	12	588	600
	16	650	666
	16	583	599
	18	580	598
	09	602	611
	11	689	700
	11	665	676
	12.25	629 ± 45.47	641 ± 43.30
T4	44	507	551
	20	470	490
	33	447	480
	03	637	640
	19	531	550
	20	479	499
	10	581	591
	06	628	634
	19.38	535 ± 72.78	554 ± 63.00

Continued / Suite page suivante

Table II. Continued / *Tableau II. Suite.*

Treatments	Number of unfertilised eggs	Number of fertilised eggs	Total eggs
<i>Traitements</i>	<i>Nombre d'oeufs non fertilisés</i>	<i>Nombre d'oeufs fertilisés</i>	<i>Total d'oeufs</i>
T5	07	501	508
	17	590	607
	11	522	533
	-	490	490
	03	588	591
	04	597	601
	01	574	575
	17	622	639
	7.50	561 ± 49.16	568 ± 52.29
T6	-	470	470
	03	567	570
	09	665	674
	07	512	519
	40	621	661
	13	688	701
	07	604	611
	01	353	354
	10.00	540 ± 111.08	570 ± 117.84
T7	05	585	590
	04	633	637
	09	568	577
	11	599	610
	13	588	601
	02	624	726
	03	563	566
	-	599	519
	5.88	594.88 ± 24.55	603.25 ± 60.48
T8	04	616	620
	13	678	691
	02	689	691
	-	650	650
	-	575	575
	11	655	666
	02	634	636
	02	590	592
	4.25	635.875 ± 40.30	640 ± 42.97

Continued / *Suite page suivante*

Table II. Continued / *Tableau II. Suite.*

Treatments	Number of unfertilised eggs	Number of fertilised eggs	Total eggs
<i>Traitements</i>	<i>Nombre d'oeufs non fertilisés</i>	<i>Nombre d'oeufs fertilisés</i>	<i>Total d'oeufs</i>
T9	08	725	733
	14	747	761
	11	660	671
	20	565	585
	03	589	592
	03	669	672
	10	650	660
	06	695	701
	9.25	663 ± 62.35	672 ± 61.64
Control <i>Témoin</i>	04	580	584
	09	550	559
	01	588	589
	01	577	578
	05	590	595
	03	589	592
	03	591	594
	02	573	575
	3.50	579.75 ± 13.75	583.25 ± 12.23

Analysis / *Analyse*'t' values and significance levels / *Valeurs de "t" et seuils de signification*

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\Sigma \sqrt{1/n + 1/m}}$$

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
't'	1.324	0.473	2.94	1.71	1.197	0.499	1.521	3.73	4.089
Significance levels	NS	NS	5 %	NS	NS	NS	NS	1 %	1 %
<i>Seuils de signification</i>								5 %	5 %

NS : Not significant / *Non significatif.*1 % : Significant / *Significatif.*5 % : Significant / *Significatif.*

Further, the test of efficiency of ascorbic acid on different larval instars brought out that when fed to silkworms from 1st to 5th (T1), it does not have any marked influence on fecundity.

Feeding of ascorbic acid with mulberry leaves during I and II (T5 and T6) stages also does not exhibit any change in the pattern of fecundity. There is a gradual appreciation in fecundity (T7, T8 and T9) when fed in III, IV and V stages. It reaches the most significant phase when larvae in V stage are fed with 10 % ascorbic acid.

In the present studies, the silkworm larvae of T1 and T2 batches, which received ascorbic acid fortified leaves from 1st to 5th and 2nd to 5th instars respectively, did not show any significant increase in the total number of eggs laid. This is probably due to the inhibiting action of ascorbic acid in early stages of larval growth. Ito and Arai (1965) have also observed reduction in larval weight when fed with higher concentration of ascorbic acid in artificial diet in early stages. They found 20 mg/g as the optimum level of ascorbic acid concentration for normal growth in later larval stages where it acts as a growth promoter. The significant increase in fecundity as recorded in this study, when fed in later larval stages, is in conformity with the findings of Murthy (1953) and Ito and Arai (1965) in the silkworm (*Bombyx mori* L.).

The significant increase in egg production as recorded in the batches where larvae in later stages were fed with enriched mulberry leaves can be attributed to the better larval and pupal growth and size as observed by Krishnaswamy *et al.* (1978) and Mukherjee *et al.* (1983) in *Bombyx mori* L., Thomas *et al.* (1982) in *Antheraea polyphemus* and Muthukrishnan and Pandian (1987) in other insect species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The facilities made available at Regional Sericultural Research Station (Central Silk Board) (Majra, Dehradun, Uttar Pradesh) are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1980) Textbook of Tropical Sericulture. Japanese Overseas Co-operation Volunteers, Tokyo, Japan.
- CARO L. De, ROVITA E. (1939) Vitamin C in mulberry leaves and silkworms. *Quand. Nutri.*, 6, 91-96.
- DADD R.H. (1957) Ascorbic acid and carotene in the nutrition of the desert locust, *Schistocerca gregaria* F. *Nature*, 179, 427-428.
- DADD R.H. (1960a) The nutritional requirement of locusts: I. Development of synthetic diet. *J. Insect Physiol.*, 4, 319-347.
- DADD R.H. (1960b) Some effects of dietary ascorbic acid on locusts. *Proc. Roy. Soc., B.* 153, 128-143.
- ITO T. (1961a) Nutrition on the silkworm, *Bombyx mori* L. IV. Effects of ascorbic acid (English). *Bull. Seric. Exp. Sta.*, 17(1), 134-137.
- ITO T. (1961b) Effect of dietary ascorbic acid on the silkworm, *Bombyx mori* L. *Nature*, 192, 951-952.
- ITO T., ARAI N. (1965) Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* L. : IX. Further studies on the nutritive effects of ascorbic acid (English). *Bull. Seric. Exp. Sta.*, 20(1), 16-19.
- KRISHNASWAMY S., KAMALA SINGH, RAGHURAMAN R., GEETHADEVI R.G. (1978) Studies on the relationship between pupal weight and fecundity. Annual Report, CSRTI Mysore, India.
- MUKHERJEE P.K., ROY A.K., CHOUDHURY N.G. (1983) Studies on the effect of pupal weight on fecundity and hatchability in multivoltine silkworm (*B. mori* L.) race. National Seminar on Silk Research and Development, Bangalore, India.
- MURTHY M.R.V. (1953) Studies on the nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* L. Thesis, University, Bangalore (India) cited in Friend W.G. (1956) Nutritional requirement of phytophagous insects. *Ann. Rev. Ent.*, 3, 57-74.
- MUTHUKRISHNAN J., PANDIAN T.J. (1987) Relation between feeding and egg production in some insects. *Proc. Indian Acad. Sci. (Animal Cell)*, 96(4), 171-179.

- SENGUPTA K., DUTTA R.K., SINGH B.D., MUSTAFI J.C. (1972) Nutrition of silkworm, *Bombyx mori* L. I. Studies on the enrichment of mulberry leaf with various sugars, proteins, amino acids and vitamins for vigorous growth of larvae and increased cocoon crop production. Indian J. Seric., 11(1), 11-18.
- TANAKA Y. (1964) Sericology. Published by Central Silk Board, Govt. of India.
- THOMAS A., MILLER W.J.C., JERRY W.H. (1982) Relationship between pupal size and egg production in reared female moth, *Antheraea polyphemus*. Ann. Ent. Soc. Amer., 75(1), 107.
- THORSTEINSON A.J. (1958) Acceptability of plants for phytophagous insects. Proc. 10th Intern. Cong. Ent., 2, 599-602.
- YOKOYAMA T. (1962) Synthesised science of sericulture. Published by Central Silk Board, Bombay, Govt. of India.

ETUDES SUR L'EFFET DE L'ACIDE ASCORBIQUE (VITAMINE C) SUR LA FECONDITE CHEZ LE VER A SOIE DU MURIER (*BOMBYX MORI* L.)

T.P.S CHAUHAN & KAMALA SINGH

Regional Sericultural Research Station, Majra, Dahrudun - 248 171, Inde.

L'acide ascorbique (vitamine C) augmente la capacité de ponte du papillon femelle lorsqu'il est ingéré sous forme de solution aqueuse à 10 % vaporisée sur les feuilles de mûrier par les larves des derniers âges (3e, 4e et 5e). A plus faible concentration, il n'a aucune influence marquée ni sur la santé des larves ni sur la fécondité des papillons. Le traitement à l'acide ascorbique dès les premiers âges (1er et 2e) ne semble pas avoir d'effet sur la fécondité.

INTRODUCTION

Le ver à soie du mûrier (*Bombyx mori* L.) est strictement monophage et le mûrier (*Morus* spp.) sa seule plante nourricière. La qualité des feuilles de mûriers données comme aliment au ver à soie a donc un impact majeur sur la santé et la croissance des vers à soie et sur la qualité des cocons de soie qu'ils produisent.

Des études extensives ont été réalisées sur les besoins nutritionnels du ver à soie. La perfection a atteint le niveau d'un aliment synthétique avec ou sans feuilles de mûrier.

Les protéines, les vitamines, les hydrates de carbone, les lipides et les minéraux ainsi que leurs effets sur la santé et la robustesse des larves de ver à soie ont été étudiés par plusieurs chercheurs. Caro et Roviati (1939) ont détecté la présence de la vitamine C (acide ascorbique) dans la feuille de mûrier. Sengupta et coll. (1972) ont étudié les effets des acides aminés, du sucre et des vitamines sur la santé des vers à soie. Murthy (1953) a étudié les valeurs nutritionnelles des vitamines pour les vers à soie. Ito (1961a, 1961b) a observé l'action stimulante du nourrissage avec de l'acide ascorbique lorsqu'il est ajouté à l'aliment synthétique aux derniers stades larvaires. Ito et Arai (1965) ont confirmé que l'acide ascorbique n'est pas synthétisé dans le corps des vers à soie. Thorsteinson (1958) a mis en évidence l'effet phagostimulant de l'acide ascorbique chez plusieurs espèces d'insectes. Des observations similaires ont été faites par Dadd (1957, 1960a, 1960b) chez deux espèces d'acridiens.

La relation entre le nourrissage et la production d'oeufs chez certaines espèces d'insectes au cours des stades larvaire et adulte a été étudiée par Muthukrishnan et Pandian (1987) et d'autres chercheurs. Ito (1961a, 1961b) et Ito et Arai (1965) ont détecté des vitamines influençant la physiologie du ver à soie et la maturation des gonades. Cependant, on ne dispose que d'informations fragmentaires sur l'influence des vitamines (acide ascorbique) sur la fécondité. Cette étude vise à déterminer l'effet du nourrissage à différents âges larvaires avec de l'acide ascorbique sur la fécondité chez les vers à soie.

MATERIELS ET METHODES

JD6, l'une des races bivoltines les plus utilisées de la Regional Sericultural Research Station (Majra, Dehradun), a été choisie comme matériel expérimental pour cette étude. Pendant toute la durée de l'étude, des larves de ver à soie de cette race, réparties en lots traités et non traités, ont été nourries avec des feuilles de mûrier de la variété S146, originaire de Berhampore (Bengal occidental),

maintenant cultivée de façon extensive dans la région. On a suivi les méthodes d'élevage standard (Yokoyama, 1962 ; Tanaka, 1964 ; Anonyme, 1980) pour tous les lots expérimentaux et témoins.

Dans l'enquête préliminaire, on a vaporisé, à l'aide d'un atomiseur, de l'acide ascorbique dilué dans une solution aqueuse à trois concentrations, à savoir : 5, 10 et 15 %, sur des feuilles de mûrier fraîchement cueillies. Les feuilles sont séchées à température ambiante avant le nourrissage des larves de vers à soie des trois lots expérimentaux du troisième au cinquième âge, lorsque les activités métaboliques et la synthèse des protéines sont plus élevées. Des feuilles normales ont été données aux larves des lots témoins après vaporisation d'eau et séchage.

Une fois l'élevage terminé, les cocons des différents traitements ont été récoltés et ouverts. Les chrysalides sont sexées en fonction de la présence des marquages sexuels pupaux et pesées individuellement. Les chrysalides d'une même fourchette de poids sont conservées dans des coques vides jusqu'à émergence.

A l'émergence, les papillons femelles des différents lots traités sont accouplées avec les mâles de même lot pendant environ quatre heures. Les papillons mâles sont utilisés une seule fois. Les nombres d'œufs pondus par les papillons femelles pendant 1,5 jours ou jusqu'à la fin de la ponte sont relevés individuellement.

Sur la base des observations faites et des données enregistrées au cours de l'enquête préliminaire, les études sur l'effet de l'acide ascorbique à une concentration de 10 % ont été poursuivies selon les mêmes méthodes afin de déterminer l'effet du nourrissage avec de l'acide ascorbique à différents stades larvaires selon la méthode décrite ci-dessous :

- T1 : Larves nourries avec des feuilles traitées du 1er au 5e âge.
- T2 : Larves nourries avec des feuilles traitées du 2e au 5e âge.
- T3 : Larves nourries avec des feuilles traitées du 3e au 5e âge.
- T4 : Larves nourries avec des feuilles traitées du 4e au 5e âge.
- T5 : Larves nourries avec des feuilles traitées au 1er âge uniquement.
- T6 : Larves nourries avec des feuilles traitées au 2e âge uniquement.
- T7 : Larves nourries avec des feuilles traitées au 3e âge uniquement.
- T8 : Larves nourries avec des feuilles traitées au 4e âge uniquement.
- T9 : Larves nourries avec des feuilles traitées au 5e âge uniquement.

Les larves nourries avec des solutions aqueuses d'acide ascorbique à 10 % sont divisées en plusieurs groupes pour les opérations de sélection et de grainage. La signification des données expérimentales est calculée selon le test "t" de Student.

RESULTATS ET DISCUSSION

Au cours de la première phase expérimentale, trois concentrations, à savoir : 5 %, 10 % et 15 %, d'acide ascorbique sous forme de solution aqueuse ont été vaporisées sur les feuilles de mûrier et les feuilles enrichies ont été données comme aliment aux larves du 3e au 5e âge réparties en trois lots différents. Les lots de vers à soie nourris avec de l'acide ascorbique à 10 % présentent non seulement une amélioration manifeste de la santé larvaire mais également de la fécondité par rapport aux lots nourris avec une concentration à 5 % et par rapport aux témoins. La concentration à 15 % d'acide ascorbique ne fait apparaître aucune augmentation significative de la fécondité par rapport à la concentration à 10 % (Tableau I).

L'acide ascorbique à la concentration de 10 % semble être la dose optimale pour l'amélioration de la fécondité.

On remarque également que le nourrissage avec des feuilles de mûrier enrichies avec 10 % d'acide ascorbique n'a aucune influence marquée sur la fécondité lorsqu'il est fait aux premiers âges (T1, T2) par rapport aux lots nourris du 3e au 5e âge avec des feuilles traitées (T3, T4). Il est clair que les larves des derniers âges, qui ont des activités métaboliques plus fortes, sont plus sensibles au traitement (Tableau II).

De plus, le test de l'efficacité de l'acide ascorbique suivant les différents âges larvaires montre qu'il n'a aucun effet prononcé sur la fécondité chez les vers à soie traités du 1er au 5e âge (T1).

Le nourrissage avec des feuilles de mûrier traitées à l'acide ascorbique au cours des premier et deuxième âges (T5 et T6) n'entraîne aucune modification de la fécondité. On observe une amélioration progressive de la fécondité chez les lots traités aux 3e, 4e et 5e âges (T7, T8 et T9). Cette amélioration atteint son seuil le plus significatif lorsque les larves du 5e âge sont traitées avec 10 % d'acide ascorbique.

Dans cette étude, les larves de vers à soie des lots T1 et T2, qui ont reçu des feuilles enrichies en acide ascorbique respectivement du 1er au 5e âge et du 2e au 5e âge, ne donnent pas d'augmentation significative du nombre total d'oeufs pondus. Ceci pourrait être dû à l'action inhibitrice de l'acide ascorbique aux premiers âges sur la croissance larvaire. Ito et Arai (1965) ont observé une diminution du poids larvaire chez les larves des premiers âges nourries avec un aliment artificiel contenant une concentration élevée en acide ascorbique. Ils ont montré que 20 mg/g constituait le niveau optimum de concentration en acide ascorbique pour une croissance normale dans les derniers âges larvaires pour lesquels il sert de promoteur de croissance. L'augmentation significative de la fécondité enregistrée dans cette étude, après traitement des derniers âges, est conforme aux résultats de Murthy (1953) et d'Ito et Arai (1965) chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.).

L'augmentation significative de la production d'oeufs enregistrée dans les lots où les larves des derniers âges ont été nourries avec des feuilles de mûrier enrichies peut être attribuée à une meilleure croissance et une meilleure taille de la larve et de la chrysalide, ainsi que l'ont observé Krishnaswamy et coll. (1978) et Mukherjee et coll. (1983) chez *Bombyx mori* L., Thomas et coll. (1982) chez *Antheraea polyphemus* et Muthukrishnan et Pandian (1987) chez d'autres espèces d'insectes.

STUDIES ON THE PRESERVATION OF SEED COCOONS OF THE TASAR SILKWORM, *ANTHERAEA MYLITTA* D., DURING DIAPAUSE

M.L. KAPILA, A. CHAUDHURI, O.P. DUBEY, C.C. CHAUDHURY & S.S. SINHA

Central Tasar Research and Training Institute, Field Laboratory, Piska Nagri, Ranchi - 834 303, Bihar, India.

Seed cocoons of A. mylitta D. were preserved in different grainage houses, viz., model grainage, porta cabin and underground grainage house during diapause with a view to obtaining the best possible grainage performances. The studies made reveal that in the underground grainage house, significantly minimal pupal mortality and erratic emergence coupled with maximum moth emergence during the normal grainage period, coupling, fecundity and hatching were recorded as compared to the model grainage house and porta cabin. The optimum seed preparation results of the underground grainage house counterchecked with the climatological factors as recorded therein. The average temperature and relative humidity prevailing during the preservation period were found to be nearest the optimum ranges besides fluctuations being the minimum in the underground grainage house out of all the three preservation houses.

Keywords : Tasar silkworm, diapause, emergence, coupling, fecundity, hatching.

INTRODUCTION

The Indian tasar silkworm, *A. mylitta* D., produces two to three crops in a year (July-August, September-October and November-December) and in bivoltine areas/stocks seed cocoons undergo pupal diapause for a period of about seven months. A substantial portion of the seed cocoons is lost due to pupal mortality and erratic moth emergence during diapause. Moreover, on account of its wild nature, the tasar silkworm suffers from an inherent character of non-uniform growth even in the brood of the same mother moth. Thus, cocoon spinning, moth emergence, etc. are all irregular in tasar culture, thereby causing practical problems. This may be due to cold and heat stupors and constant reaction of temperature and relative humidity upon one another (Wigglesworth, 1973). Inherent characters of low fecundity have further deteriorated to a lower level of late in the tasar moth. All these may be due to the high temperature and low relative humidity as the ranges of 26 °C-28 °C and 70-80 %, respectively (Jolly *et al.*, 1974) recommended so far for tasar seed production are not naturally obtainable in the grainage house raised at earth level. In fact, in summer months, the temperature goes beyond 38 °C and relative humidity comes down to 30 % with much wider fluctuations. During the months of April, May and June over the past thirty years (1956-1986) in Ranchi the temperature ranged between 15.5 °C and 38.9 °C, 18.4 °C and 40.8 °C and 21.1 °C and 39.7 °C, respectively.

In view of the above, this experiment was conducted to find out the optimum conditions for seed cocoon preservation of tasar silkworms to ensure minimal pupal mortality/erratic emergence and the best possible result of moth emergence, coupling, oviposition and hatching. An endeavour was also thus made under this experiment to design a suitable chamber for proper seed cocoon preservation, etc., with optimum conditions obtainable therein without resorting to artificial expensive methods.

MATERIALS AND METHODS

Seed cocoons of bivoltine stocks of *A. mylitta* D. were preserved during the diapause period (from April to June) in three different grainage houses each year as follows :

a) Model grainage house (MGH) :

As improvised in the past by Central Tasar Research Station (Ranchi, India) with mud walls, country tile roofing, all-round verandah (8' wide) and adequate aeration facilities (one door and four windows) with overall specifications of 51' $\times$ 36' outside and 35' $\times$ 20' inside (Plate 1).



Plate 1 : Model grainage house (MGH) /Cliché 1 : Grainage modèle.

b) Porta cabin (PC) :

A completely wooden structure with an insulated aluminium sheet roofing having four adjoining glass ventilators on top of trestlework besides four windows and two doors as supplied by M/s Bombay (Camping Corner), Bombay, India. The specifications of the cabin used were 12' $\times$ 32' with 9.5' central height on 8' walls (Plate 2).

c) Underground grainage house (UGH) :

A chamber dug underground with specifications of 20' $\times$ 15' $\times$ 8' (length $\times$ width $\times$ depth) and covered by thatch roofing on top, over an open space left for aeration through a provision of split bamboo scaffoldings (Plate 3).

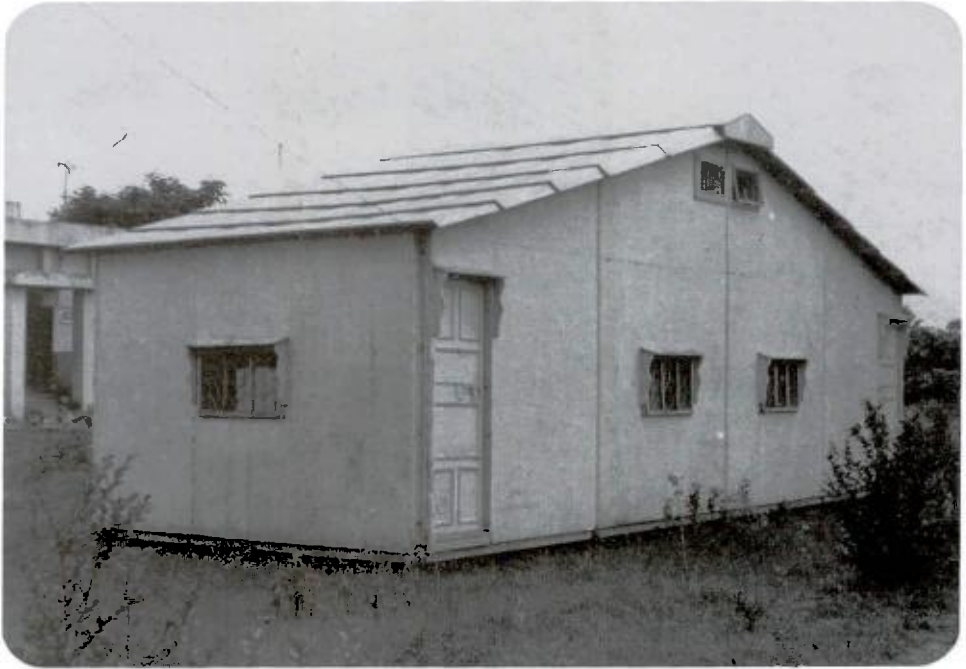


Plate 2 : Porta cabin (PC) / *Cliché 2 : Cabane Porta (PC).*



Plate 3 : Underground grainage house (UGH) / *Cliché 3 : Grainage souterrain (UGH).*

One thousand to three thousand live pupae selected at random (3 treatments $\times$ 2 sexes $\times$ 6 replications) were preserved in each grainage house from the first week of April till completion of seed preparation. The temperature ($^{\circ}\text{C}$) and relative humidity percentage along with their ranges prevailing in the three chambers were noted down. Further, sex-wise moth emergence (erratic and normal separately), pairing percentage, pupal mortality and average fecundity were recorded during the seed preparation period each year in the three preservation chambers. Following oviposition the eggs were taken out of each chamber and incubated separately at $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in an identical manner. This experiment was conducted for three consecutive years and the data thus obtained were subjected to statistical analysis through Student's 't' test.

RESULTS

a) Details of temperature prevailing in the three preservation chambers (Fig. 1, 2 and 3) :

As will be evident from the above mentioned figures, the average data computed for the three years concerned and recorded for the months of April, May and June revealed that during the daytime (from 8.00 a.m. to 5.00 p.m.) fluctuations and absolute degrees of daily temperature were significantly lower in UGH than those recorded in either MGH or PC. The monthly average temperature recorded consequently also indicated the same trend. Interestingly, on account of the release of latent heat the UGH maintained optimum levels of temperature following the commencement of rains also during the seed production period. Earlier in the summer months, however, the radiation effect was lacking in UGH, which ensured optimum microenvironment therein for seed preservation, moth emergence, pairing, fecundity, etc.

b) Record of the relative humidity percentage prevailing (Fig. 4, 5 and 6) :

It emerges from Figs. 4, 5 and 6 that the relative humidity percentage was very low and coupled with very wide fluctuations thereof in MGH and PC as compared to UGH especially during the months of April and May. On the other hand, RH % remained more or less constant at optimum level with narrow fluctuations in UGH throughout the preservation period. This also proved conducive for seed cocoon preservation and grainage operations.

c) Absolute moth emergence and its pattern (Fig. 7) :

It is quite clear from the relevant figure that erratic emergence of both male and female moths was significantly higher ($P < 0.001$) in MGH and PC as compared to UGH. However, the overall erratic moth emergence percentage (recorded for April and May) in general was found to be low. Normal emergence of male and female moths taken for the period of seed preparation in June, however, was found to be significantly higher in UGH ($P < 0.01-0.001$) than those recorded in MGH or PC. Hence in both aspects, viz. absolute moth emergence and its patterns, UGH recorded positively better results.

d) Pairing percentage (Fig. 8a) :

The natural pairing (self-coupling) percentage of moths recorded was significantly higher in UGH ($P < 0.001$) than that of MGH and PC, as perusal of Fig. 8a will clearly reveal. However, there were no significant differences in the coupling behaviours among moths emerged in stocks kept in MGH and PC.

e) Pupal mortality (Fig. 8b) :

The total pupal mortality was the minimum in UGH as compared to MGH and PC. Further, the maximum pupal mortality was recorded in PC (Fig. 8b) as the temperature prevailing in the cabin all through touched the maximum mercury level among the three chambers. These results are clearly reflected in Figs. 1, 2 and 3.

f) Fecundity (Fig. 8c) :

The average fecundity, as shown in Fig. 8c, was found to be significantly higher in UGH ($P < 0.01$) emerged moths out of the stocks preserved separately in the three chambers. Further, moths emerged out of MGH preserved stocks recorded a significantly higher ($P < 0.001$) fecundity than in the case of porta cabin.

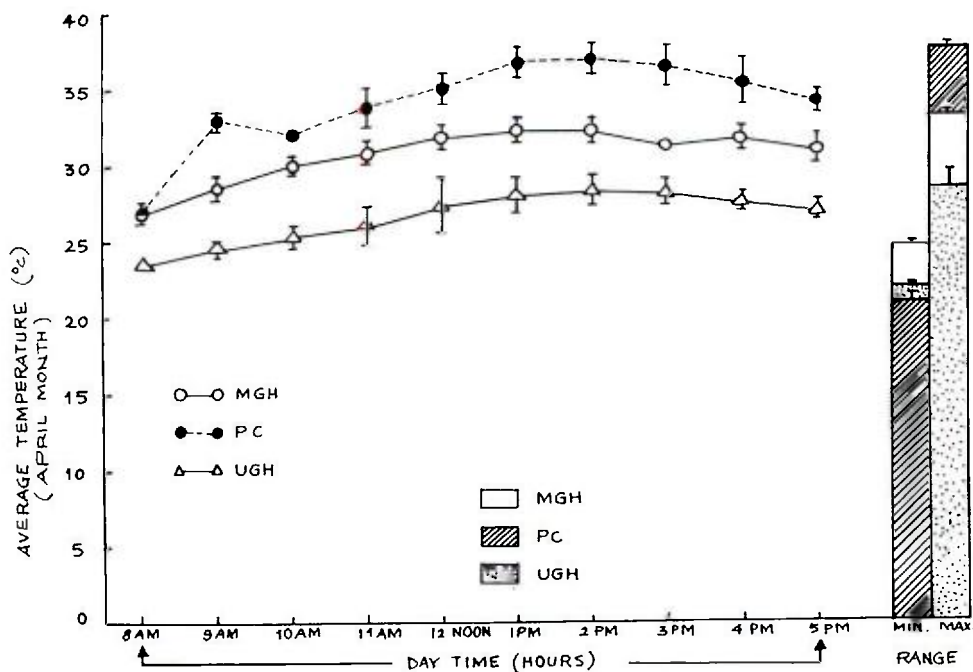


Fig. 1 : Variations of average temperature (°C) during specific day hours and fluctuations in minimum-maximum temperature (°C) recorded during the month of April 1987, 1988 and 1989 in the three grainage houses.

Each mean value represents the average temperature of three years. Vertical bar represents the standard error of the mean.

Fig. 1 : Variations de la température moyenne (°C) à des heures spécifiques de la journée et fluctuations des minimales et des maximales (°C) enregistrées en avril pour les années 1987, 1988 et 1989 dans les trois grainages

Chaque valeur moyenne correspond à la température moyenne des trois années. Les barres verticales donnent les écarts types de la moyenne.

g) Hatching percentage (Fig. 8d) :

As is evident from Fig. 8d, the maximum hatching percentage was recorded in UGH, being significantly higher ($P < 0.01$) than both MGH and PC results even though the eggs were removed in each case and placed into the incubator after oviposition. Further, significant differences ($P < 0.001$)

in the hatching percentage were also found among eggs produced in MGH and PC, with MGH recording second best results.

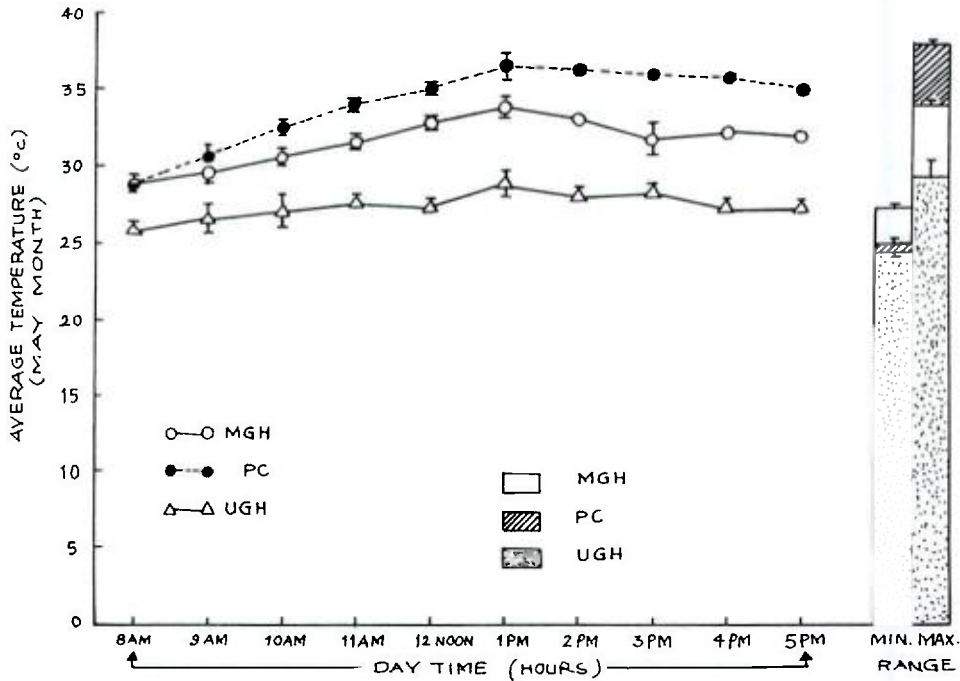


Fig. 2 : Variations of average temperature (°C) during specific day hours and fluctuations in minimum-maximum temperature (°C) recorded during the month of May 1987, 1988 and 1989 in the three grainage houses.

Each mean value represents the average temperature of three years. Vertical bar represents the standard error of the mean.

Fig. 2 : Variations de la température moyenne (°C) à des heures spécifiques de la journée et fluctuations des minimales et des maximales (°C) enregistrées en mai pour les années 1987, 1988 et 1989 dans les trois grainages.

Chaque valeur moyenne correspond à la température moyenne des trois années. Les barres verticales donnent les écarts types de la moyenne.

DISCUSSION

Trials to correlate the major physiological effects of climate to thermal balance and microclimatic interactions with temperature, etc., have been made in the past (Willmer, 1982). Further, the daily patterns of behaviour of insects were found affected by species-specific times of the day in activity

like mating, oviposition, etc., of most insects besides confirming that their different activity habits are governed by daily cycles of temperature, humidity, etc. (Beck, 1980 ; Engelmann, 1984). Consequently, the said correlations and behaviour patterns were exploited in the underground grainage house. Harnessing the desirable natural factors such as underground soil properties and averting the adverse effects of other natural factors like temperature, etc., manifested into the best results being recorded in underground grainage house (UGH) because :

During the summer radiation pushing the temperature to very high ranges in chambers built at earth level is altogether lacking in UGH which thus maintains lower and narrow ranges of temperature due to absorption of heat coupled with high relative humidity percentages on account of soil moisture in UGH.

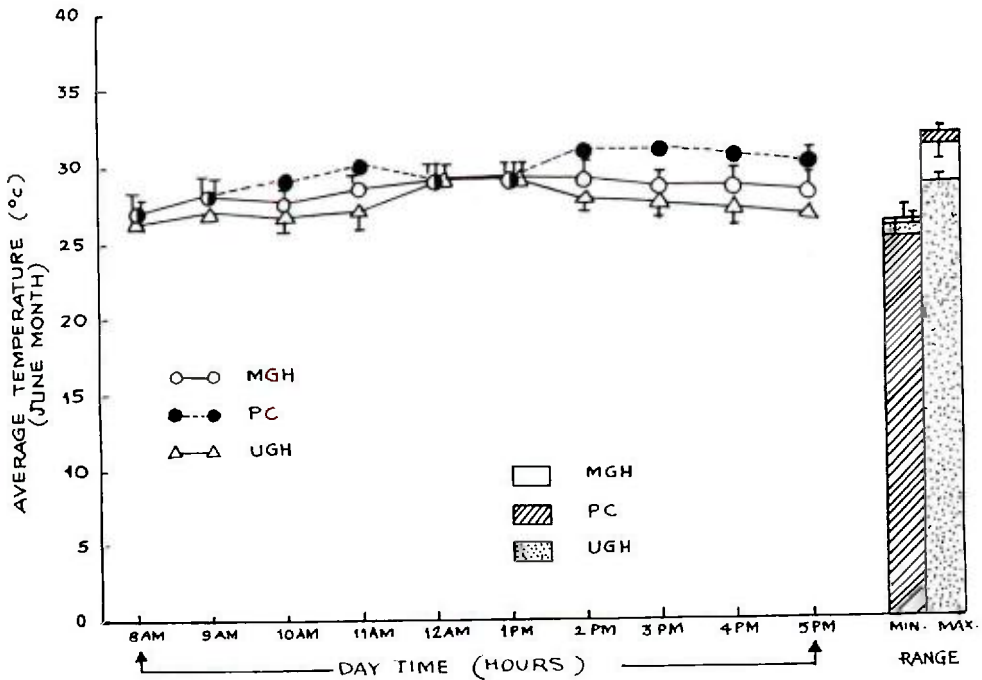


Fig. 3 : Variations of average temperature (°C) during specific day hours and fluctuations in minimum-maximum temperature (°C) recorded during the month of June 1987, 1988 and 1989 in the three grainage houses.

Each mean value represents the average temperature of three years. Vertical bar represents the standard error of the mean.

Fig. 3 : Variations de la température moyenne (°C) à des heures spécifiques de la journée et fluctuations des minimales et des maximales (°C) enregistrées en juin pour les années 1987, 1988 et 1989 dans les trois grainages.

Chaque valeur moyenne correspond à la température moyenne des trois années. Les barres verticales donnent les écarts types de la moyenne.

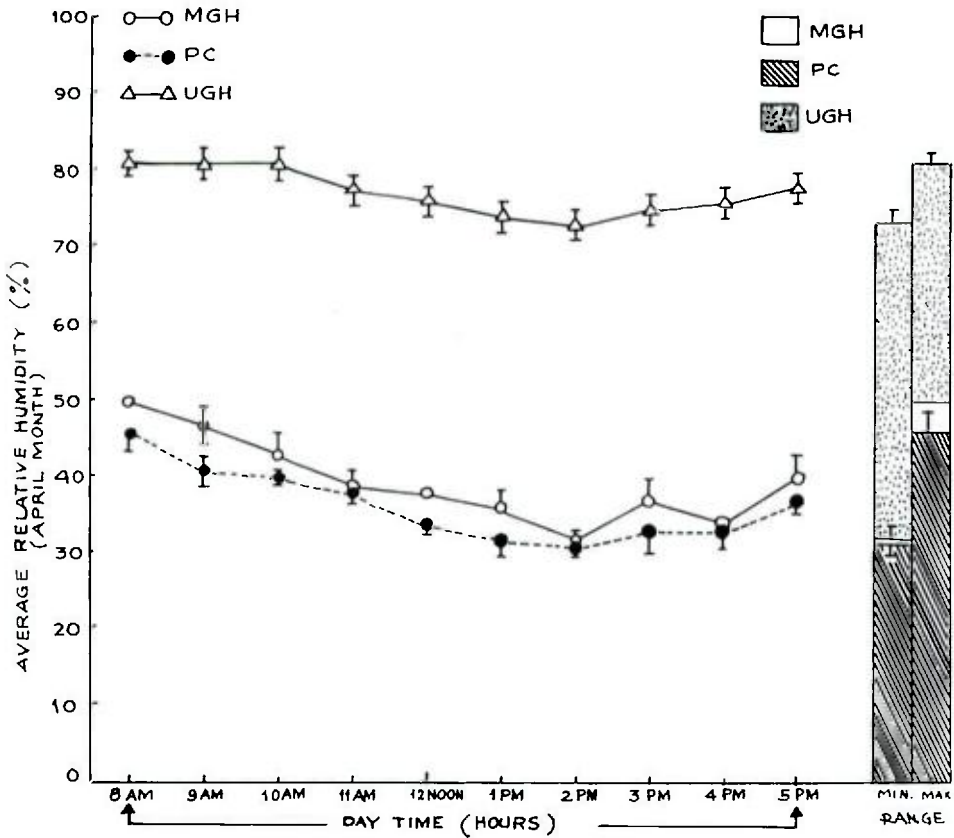


Fig. 4 : Variations of the relative humidity percentage and ranges of its fluctuations on specific day hours recorded during the month of April 1987, 1988 and 1989 in the three grainage houses.

Each mean value represents the average RH (%) for the three years. Vertical bar represents the standard error of the mean.

Fig. 4 : Variations du pourcentage d'humidité relative et amplitudes des fluctuations à certaines heures précises de la journée enregistrées en avril pour les années 1987, 1988 et 1989 dans les trois grainages.

Chaque valeur moyenne correspond à l'humidité relative moyenne des trois années. Les barres verticales donnent les écarts types de la moyenne.

During the rainy season, however, the latent heat of the soil helps in maintaining similar optimum conditions for seed preparation in the underground chamber further.

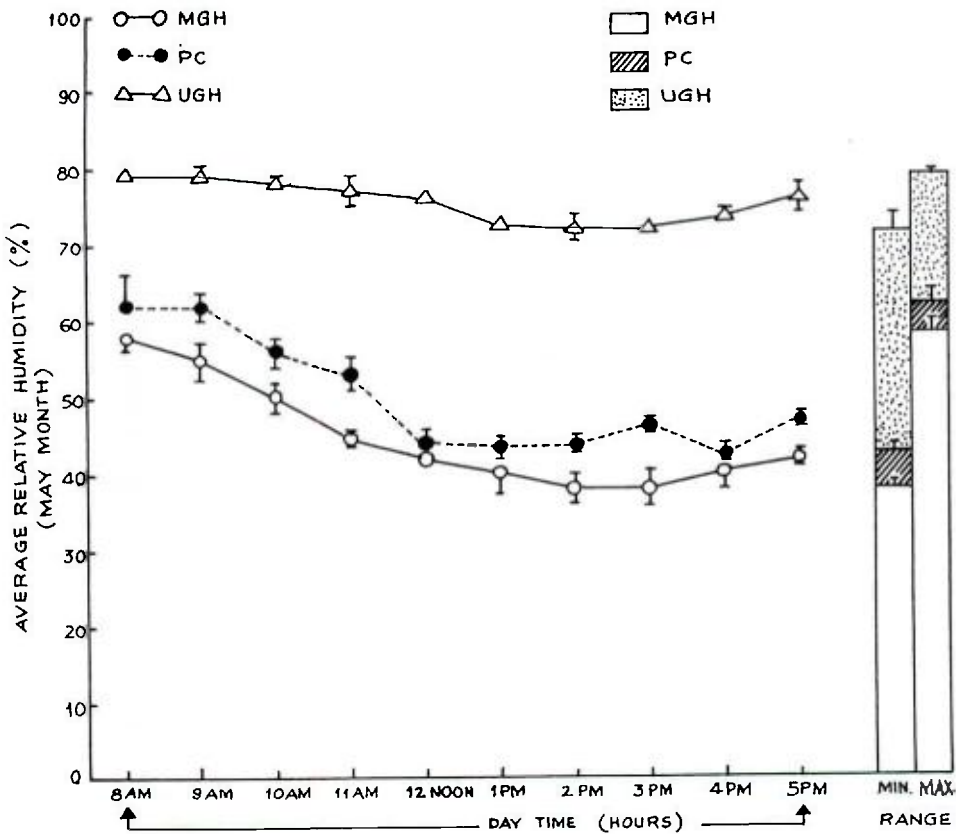


Fig. 5 : Variations of the relative humidity percentage and ranges of its fluctuations on specific day hours recorded during the month of May 1987, 1988 and 1989 in the three grainage houses.

Each mean value represents the average RH (%) for the three years. Vertical bar represents the standard error of the mean.

Fig. 5 : Variations du pourcentage d'humidité relative et amplitudes des fluctuations à certaines heures précises de la journée enregistrées en mai pour les années 1987, 1988 et 1989 dans les trois grainages.

Chaque valeur moyenne correspond à l'humidité relative moyenne des trois années. Les barres verticales donnent les écarts types de la moyenne.

Seed cocoon preservation in UGH thus resulted in minimal pupal mortality and maximal moth emergence. While erratic moth emergence was further minimum in UGH, it also had the maximum normal moth emergence leading to a higher pairing percentage and thus seeds produced.

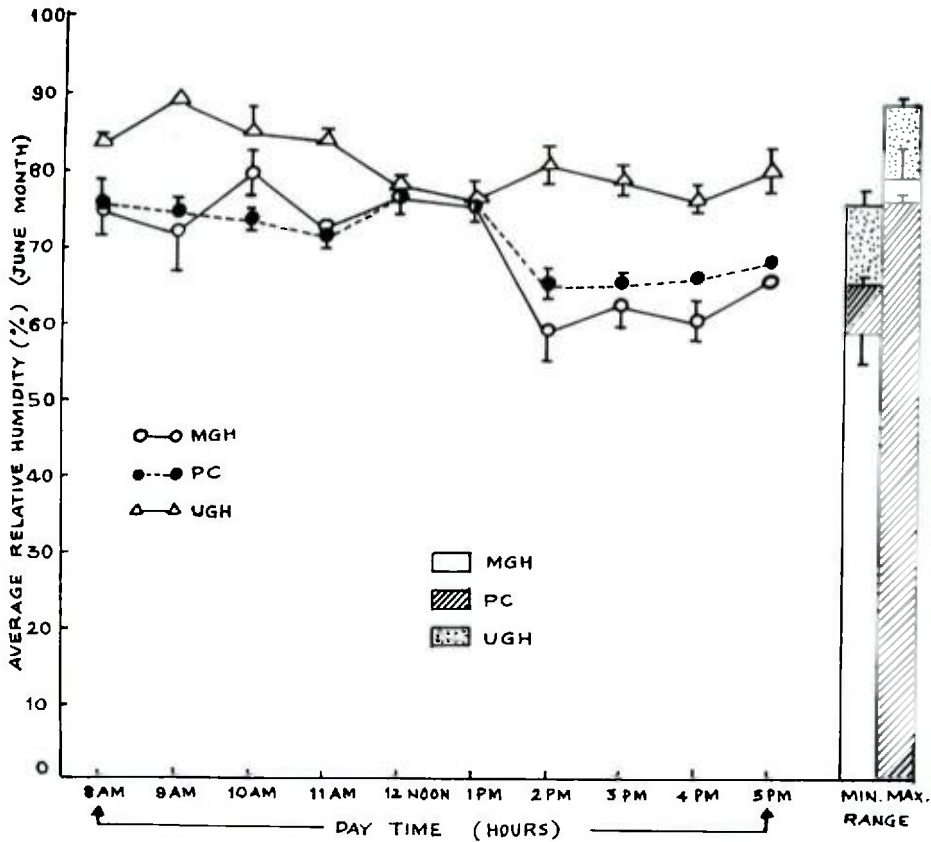


Fig. 6 : Variations of the relative humidity percentage and ranges of its fluctuations on specific day hours recorded during the month of June 1987, 1988 and 1989 in the three grainage houses.

Each mean value represents the average RH (%) for the three years. Vertical bar represents the standard error of the mean.

Fig. 6 : Variations du pourcentage d'humidité relative et amplitudes des fluctuations à certaines heures précises de la journée enregistrées en juin pour les années 1987, 1988 et 1989 dans les trois grainages.

Chaque valeur moyenne correspond à l'humidité relative moyenne des trois années. Les barres verticales donnent les écarts types de la moyenne.

The oviposition factor was also the best in UGH out of the three houses by virtue of the optimum level of the microenvironment obtainable naturally therein.

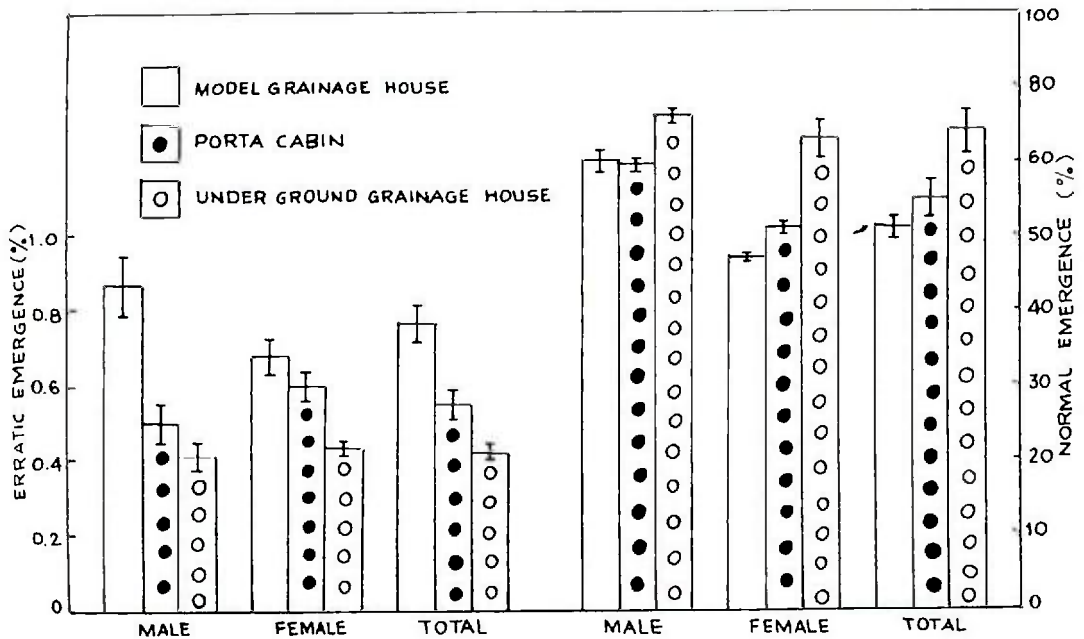


Fig. 7 : Patterns of moth emergence of *A. mylitta* D. as recorded during the seed cocoon preservation period in the three chambers.

While moth emergence occurred in April and May was treated as erratic, the normal moth emergence shown relates to the month of June each year. Each mean value represents the average for the three year. Vertical bar represents the standard error of the mean.

Fig. 7 : Modalités d'émergence des papillons chez *A. mylitta* D. relevés au cours de la période de conservation des cocons destinés au grainage dans les trois sites.

L'émergence des papillons survenue en avril et en mai est irrégulière, l'émergence normale a lieu au mois de juin de chacune des années. Chaque valeur moyenne correspond à la moyenne des trois années. Les barres verticales donnent les écarts types de la moyenne.

The hatching percentage results, which were by far the best in eggs produced out the stocks preserved in UGH, reveal that the lower temperature and high RH % prevailing from cocoon preservation till oviposition have a lasting effect as these results were obtained even as the eggs were removed earlier and placed into the incubator in each case. Health and viability of the eggs is thus improved beyond any doubt by virtue of the prevailing microenvironment of UGH, so much so that even the rearing results of these eggs should also be expected to be far better.

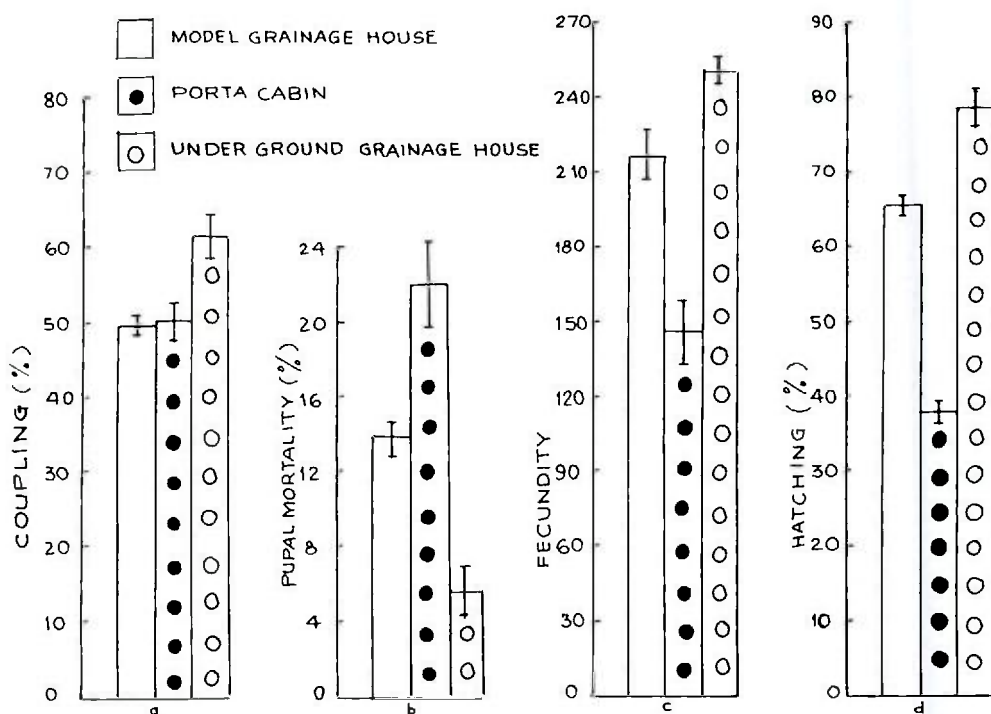


Fig. 8 : Effect of seed cocoon preservation in the three grainage houses.

- (a) on coupling behaviour,
 (b) on pupal mortality,
 (c) on fecundity,
 (d) on hatching percentage.

Each mean value represents the average of the three years. Vertical bar represents the standard error of the mean.

Fig. 8 : Effet de la conservation, dans les trois locaux, des cocons destinés au grainage.

- (a) sur l'accouplement,
 (b) sur la mortalité pupale,
 (c) sur la fécondité,
 (d) sur le pourcentage d'éclosion.

Chaque valeur moyenne correspond à la moyenne des trois années. Les barres verticales donnent les écarts types de la moyenne.

CONCLUSIONS

a) The low temperature (25-28 °C) and high RH (80-90 %) as naturally obtainable in UGH were found to be optimum and are recommended for tasar seed cocoon preservation.

b) For moth emergence also, the above hygrothermal conditions were found to be best and are thus recommended for tasar.

c) For pairing tasar moths, Jolly *et al.* (1974) recommended 26-28 °C temperature with 70-80 % RH obtainable in MGH with the aid of cool air blast. However, even better results were found with 25-28 °C temperature and 76-88 % RH recorded in UGH without any artificial aid, dependence or expense thereupon, not to mention the imposing of limitations by the artificial method. It is thus recommended that UGH recording the said optimum conditions without any aid may be made use of.

d) For oviposition of *A. mylitta*, the optimum temperature and RH are 25-28 °C and 76-88 %, respectively, as against 26-28 °C and 70-80 % recommended by Jolly *et al.* (1974). Higher than 80 % RH leads to even better results, as the model grainage house having that much RH (80 %) recorded results inferior to UGH with 88 % RH.

e) A suitable design for a permanent underground grainage house having no risk of soil caving into it, etc., will have to be finalised in such a way as to ensure the retention of all the good factors obtainable naturally in the underground grainage house.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our grateful thanks to Dr A. Wadood, Scientist (Agromer), Department of Agricultural Physics, Birsa Agriculture University, Kanke (Ranchi, Bihar) for supply of a copy of Report of Works 1983-87 "All India Coordinated Research Project on Agrometeorology (ICAR)", Kanke Centre.

REFERENCES

- BECK S.D. (1980) Insect photoperiodism. 2nd Ed., Academic Press, New York, p. 16.
ENGELMANN F. (1984) Reproduction in insects. *In* Ecological Entomology. Huffaker C.B. and Rabb R.L. eds., John Wiley and Sons, New York, p. 113-147.
JOLLY M.S., SEN S.K., AHSAN M.M. (1974) Tasar Culture. 1st Ed. Ambika Publishers, Bombay, p. 107-124.
WIGGLESWORTH V.B. (1973) The principal of insect physiology. 7th Ed., Chapman and Hall, Great Britain, p. 583.
WILLMER P.G. (1982) Microclimatics and the environmental physiology of insects. *In* Advances in insect physiology. Berridge M.J., Treherne J.E. and Wigglesworth V.P. eds., Academic Press, New York, 16, 1-57.

ETUDES SUR LA CONSERVATION PENDANT LA DIAPAUSE DES COCONS DU VER A SOIE TASAR, *ANTHERAEA* *MYLITTA* D., DESTINES AU GRAINAGE

M.L. KAPILA, A. CHAUDHURI, O.P. DUBEY, C.C. CHAUDHURY & S.S. SINHA

Central Tassar Research and Training Institute, Field Laboratory, Piska Nagri, Ranchi - 834 303,
Bihar, Inde.

Des cocons d'A. mylitta D. destinés au grainage ont été conservés dans différents locaux de grainage, à savoir : grainage modèle, cabane Porta et local souterrain, au cours de la diapause afin d'obtenir des performances de grainage optimales. Les études réalisées montrent que le local souterrain donne une diminution significative de la mortalité pupale et de l'irrégularité de l'émergence ainsi qu'une émergence maximale des papillons au cours de la période de grainage normale. L'accouplement, la fécondité et l'éclosion de ce grainage ont été comparés à ceux du grainage modèle et de la cabane Porta. La préparation optimale des graines en fonction des facteurs climatologiques est obtenue avec le grainage souterrain, comme le montrent les résultats présentés ici. La température et l'humidité relative régnant au cours de la période de conservation sont les plus proches des fourchettes optimales, les fluctuations étant minimales dans le grainage souterrain par rapport aux autres sites de conservation.

INTRODUCTION

Le ver à soie tassar indien, *A. mylitta* D., donne deux à trois récoltes par an (juin-juillet, septembre-octobre et novembre-décembre) ; dans les zones à races bivoltines, les cocons destinés au grainage subissent une diapause pupale d'environ sept mois. Du fait de la mortalité pupale et d'une émergence irrégulière des papillons au cours de la diapause, une quantité importante de cocons destinés au grainage est perdue. De plus, en raison de sa nature sauvage, le ver à soie tassar souffre d'un caractère inhérent de croissance non uniforme même dans les pontes issues d'un même papillon mère. Ainsi, le filage des cocons, l'émergence des papillons, etc., sont tous des caractères irréguliers tassar, entraînant ainsi des problèmes pratiques pour l'élevage. Ceci pourrait être dû à une léthargie causée par la chaleur ou le froid et à une interaction continue et combinée entre la température et l'humidité relative (Wigglesworth, 1973). La faible fécondité intrinsèque du papillon tassar s'est récemment encore détériorée. Ces résultats médiocres pourraient être dus à la température élevée et la faible humidité relative, les fourchettes de 26 °C à 28 °C et de 70 % à 80 % recommandés (Jolly et coll., 1974) pour la production de graines tassar n'existant pas à l'état naturel dans les grainages construits au niveau du sol. En fait, au cours des mois d'été, la température dépasse 38 °C et l'humidité relative descend à 30 % avec des fluctuations beaucoup plus importantes. Au cours des 30 dernières années (1956-1986), la température à Ranchi a fluctué entre 15 °C et 38,9 °C pour le mois d'avril, entre 18,4 °C et 40,8 °C pour le mois de mai et entre 21,1 °C et 39,7 °C pour le mois de juin.

Une expérience a donc été réalisée afin de déterminer les conditions optimales de conservation des cocons destinés au grainage chez le ver à soie tassar afin d'assurer une mortalité pupale et une émergence irrégulière minimales et d'optimiser l'émergence des papillons, l'accouplement, la ponte et l'éclosion. Cette expérience vise également à mettre au point une chambre adaptée à la conservation des cocons, réunissant ces conditions sans avoir à recourir à des méthodes artificielles onéreuses.

MATERIELS ET METHODES

Des cocons destinés au grainage de souches bivoltines d'*A. mylitta* D. ont été conservés pendant la période de diapause (d'avril à juin), chaque année, dans trois types de grainage comme suit :

a) Grainage modèle (MGH) :

Identique au type de construction proposé dans le passé par la Central Tassar Research Station (Ranchi, Inde), ce grainage est composé de murs en terre, d'une toiture en tuiles, d'une véranda circulaire (8' de large) et d'un système d'aération approprié (une porte et quatre fenêtres), il a un périmètre de 51' × 36' et une surface intérieure de 35' × 20' (Cliché 1).

b) Cabane Porta :

Structure composée entièrement de bois possédant une toiture en aluminium isolée et pourvue de quatre aérations en verre adjacents posés sur une charpente de tréteaux ainsi que de quatre fenêtres et deux portes (fournie par M/s Bombay, Camping Corner, Bombay, Inde). Les dimensions de la cabane utilisée sont de 12' × 32', avec une hauteur centrale de 9,5' sur des murs de 8' (cliché 2).

c) Grainage souterrain (UGH) :

Structure creusée sous la terre mesurant 20' × 15' × 8' (longueur × largeur × profondeur) et recouverte d'un toit de chaume pourvue d'une ouverture pour permettre l'aération à travers des échafaudages en bambou fendu (cliché 3).

De 1 000 à 3 000 chrysalides vivantes choisies au hasard (3 traitements × 2 sexes × 6 réplicats) ont été conservées dans chaque type de grainage de la première semaine d'avril à la fin de la préparation des graines. La température (°C) et le pourcentage d'humidité relative ainsi que leurs variations dans les trois grainages ont été relevés. L'émergence (irrégulière et normale séparément) des papillons en fonction de leur sexe, le pourcentage d'accouplement, la mortalité des chrysalides et la fécondité moyenne ont également été relevés chaque année au moment de la préparation des graines pour les trois types de grainage. Après l'oviposition, des oeufs ont été prélevés dans chaque grainage et incubés séparément à 28 ± 1 °C de la même manière. Cette expérience a été réalisée sur trois années consécutives et les données obtenues ont été soumises à l'analyse statistique d'après le test "t" de Student.

RESULTATS

a) Détails des températures régnant dans les trois sites de conservation (Fig. 1, 2 et 3) :

Comme le montrent les figures 1, 2 et 3, les données moyennes relevées pour les trois années concernées et enregistrées pour les mois d'avril, mai et juin révèlent que les fluctuations et les valeurs absolues de la température pendant la journée (8h00 à 17h00) sont significativement plus faibles pour le grainage souterrain que pour le grainage modèle et la cabane Porta. La température mensuelle moyenne enregistrée présente également la même tendance. Il est intéressant de noter que, du fait de l'évacuation de la chaleur latente, le grainage souterrain conserve des niveaux optimaux de température même après le début des pluies pendant la période de production d'oeufs. Au début des mois d'été, il n'y a pas d'effet de rayonnement dans le grainage souterrain, ce qui permet d'assurer un microenvironnement optimal pour la conservation des graines, l'émergence des papillons, l'accouplement, la fécondité, etc.

b) Enregistrement du pourcentage d'humidité relative (Fig. 4, 5 et 6) :

A la lecture des figures 4, 5 et 6, il apparaît que le pourcentage d'humidité relative est très faible et s'accompagne de fluctuations très importantes dans le grainage modèle et dans la cabane Porta par rapport au grainage souterrain, particulièrement en avril et en mai. Par contre, le pourcentage d'humidité relative reste à un niveau optimal et plus ou moins constant avec des fluctuations très

faibles dans le grainage souterrain pendant toute la durée de la conservation. Ce qui est également favorable pour la conservation des cocons et les opérations de grainage.

c) L'émergence des papillons et ses modalités (Fig. 7) :

La figure 7 montre clairement que l'émergence irrégulière des papillons mâles et femelles est significativement plus élevée ($P < 0,001$) dans le grainage modèle et dans la cabane Porta que dans le grainage souterrain. Cependant, dans l'ensemble, l'émergence irrégulière des papillons (enregistrée pour avril et mai) est faible. L'émergence normale des papillons mâles et femelles relevée pendant la période de préparation des graines, en juin, est significativement plus élevée dans le grainage souterrain ($P < 0,01-0,001$) que dans le grainage modèle et la cabane Porta. Le grainage souterrain donne donc de meilleurs résultats aussi bien pour ce qui concerne l'émergence absolue que le type d'émergence des papillons.

d) Pourcentage d'accouplement (Fig. 8a) :

Le pourcentage d'accouplement naturel (auto-accouplement) enregistré est significativement plus élevé pour le grainage souterrain ($P < 0,001$) que pour le grainage modèle et la cabane Porta, comme le montre clairement la figure 8a. Cependant, on n'observe aucune différence significative des comportements d'accouplement entre les papillons issus des lots conservés dans le grainage modèle et ceux des lots conservés dans la cabane Porta.

e) Mortalité pupale (Fig. 8b) :

La mortalité pupale est minimale pour le grainage souterrain par rapport au grainage modèle et à la cabane Porta. La mortalité pupale maximale a été enregistrée pour la cabane Porta (Fig. 8b) car la température régnant dans la cabane atteint le niveau le plus élevé des trois types de grainage. Ces résultats sont clairement reflétés dans les figures 1, 2 et 3.

f) Fécondité (Fig. 8c) :

La fécondité moyenne, comme le montre la figure 8c, est également significativement plus élevée chez les papillons issus du grainage souterrain ($P < 0,01$) pour tous les stocks conservés individuellement dans les trois grainages. De plus, les papillons issus des stocks conservés dans le grainage modèle donnent une fécondité significativement plus élevée ($P < 0,001$) que ceux issus des stocks de la cabane Porta.

g) Pourcentage d'éclosion (Fig. 8d) :

Comme le montre la figure 8d, le pourcentage maximal d'éclosion est enregistré pour le grainage souterrain et est significativement plus élevé ($P < 0,01$) que pour le grainage modèle et la cabane Porta bien que les oeufs aient été retirés de chaque site après l'oviposition et placés dans l'incubateur. De plus, des différences significatives ($P < 0,001$) du pourcentage d'éclosion apparaissent également entre les oeufs produits dans le grainage modèle et ceux produits dans la cabane Porta, le grainage modèle donnant des résultats intermédiaires.

DISCUSSION

Des expériences visant à établir une corrélation entre les effets physiologiques majeurs du climat et l'équilibre thermique et les interactions microclimatiques avec la température, etc. ont été réalisées (Willmer, 1982). Il a été observé que les comportements quotidiens des insectes étaient affectés par le moment de la journée en fonction de l'espèce pour des activités telles que l'accouplement, l'oviposition, etc., ce qui confirme que leurs activités habituelles sont gouvernées par les cycles journaliers de température, d'humidité, etc. (Beck, 1980 ; Engelmann, 1984). Ces corrélations et modes de comportements ont donc été exploités dans le grainage souterrain. L'aménagement de facteurs naturels recherchés tels que les propriétés du sol et la prévention des effets défavorables d'autres facteurs naturels comme la température, etc. ont permis d'obtenir des résultats optimaux dans le grainage souterrain (UGH) pour les raisons énoncées ci-après.

En été, le rayonnement, qui provoque une augmentation de la température jusqu'à des degrés très élevés dans les sites construits au niveau du sol, est totalement absent du grainage souterrain, qui conserve ainsi des fourchettes de température basses et plus étroites en raison de l'absorption de la chaleur combinée avec des pourcentages d'humidité relative très élevés du fait de l'humidité du sol dans le grainage souterrain.

Pendant la saison pluvieuse, la chaleur latente du sol contribue de la même façon au maintien de conditions optimales pour la préparation des graines dans le grainage souterrain.

La conservation des cocons destinés au grainage dans le site souterrain permet donc une mortalité pupale minimale et une émergence des papillons maximale. Le grainage souterrain combine une émergence irrégulière minimale avec une émergence normale maximale, d'où un pourcentage d'accouplement, donc de graines produites, plus élevé.

Le grainage souterrain est également plus performant que les autres types de grainage pour le facteur oviposition en raison du microenvironnement existant naturellement dans ce type de grainage.

Les résultats concernant les pourcentages d'éclosion, qui sont nettement supérieurs pour les oeufs issus des stocks conservés dans le grainage souterrain, révèlent que la faible température et l'humidité relative élevée maintenues depuis le stade de conservation des cocons jusqu'à l'oviposition ont un effet durable, car on obtient ces résultats même lorsque les oeufs sont prélevés plus tôt et placés dans l'incubateur. Le microenvironnement du grainage souterrain permet donc d'améliorer indiscutablement la santé et la viabilité des oeufs et ceci de telle façon qu'on peut même escompter des performances d'élevage nettement supérieures pour ces oeufs.

CONCLUSIONS

a) On observe que la faible température (25 à 28 °C) et l'humidité relative élevée (80 à 90 %) existant naturellement dans le grainage souterrain constituent des facteurs optimaux et sont recommandés pour la conservation des cocons tassar.

b) Pour l'émergence des papillons également, ces conditions hygrothermiques sont les plus favorables et sont recommandées pour l'élevage tassar.

c) Pour l'accouplement des papillons tassar, Jolly et coll. (1974) ont recommandé une température de 26 à 28 °C et une humidité relative de 70 à 80 %, conditions que l'on peut réunir dans le grainage modèle en utilisant une soufflerie à air froid. Cependant, on a pu obtenir des résultats encore supérieurs avec une température de 25 à 28 °C et une humidité relative de 76 à 88 % dans le grainage souterrain sans aide artificielle et sans encourir de dépenses ni subir les désavantages de la méthode artificielle. On peut donc recommander l'utilisation du grainage souterrain, qui réunit les conditions optimales décrites ci-dessus sans aide artificielle.

d) Pour l'oviposition d'*A. mylitta*, la température et l'humidité relative optimales sont respectivement de 25 à 28 °C et de 76 à 88 % contre 26 à 28 °C et 70 à 80 °C d'après Jolly et coll. (1974). Lorsqu'elle est supérieure à 80 %, l'humidité relative donne des résultats encore plus performants, le grainage modèle avec 80 % d'humidité relative donnant des résultats inférieurs au grainage souterrain avec 88 %.

e) Il sera nécessaire de mettre au point un projet approprié pour un grainage souterrain permanent prévoyant les risques d'effondrement du sol, etc. afin d'assurer le maintien de tous les facteurs positifs existant naturellement dans ce type de grainage.

TOXICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENIS* SEROTYPE H₁₄ ON *ANTHERAEA MYLITTA* D. AND *BOMBYX MORI* L.

U.P. GRIYAGHEY & K. SENGUPTA*

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi - 834 005, Bihar, India.

Toxicity of three samples of Bacillus thuringiensis H₁₄ var. israelensis de Barjac was tested against Antheraea mylitta and Bombyx mori. Three concentrations of each sample of the biocide were tested against each instar of the larvae of both silkworms. Among the three samples of the biocide, ABG-6108 was found to be most toxic, followed by VCRC, Pondicherry and Moskitur, Czechoslovakia.

Keywords : Biocide, *Bacillus thuringiensis* H₁₄ var. *israelensis*.

INTRODUCTION

Development of resistance in insect pests to certain insecticides and concern over the continued use of various chemical insecticides led to an intensive search for alternative insect control methods during the past few decades. One of the most promising biological insect control agents discovered has been the facultative spore-forming bacterium, *Bacillus thuringiensis*. The original strain of *Bacillus* used for the control of agricultural pests was *B. thuringiensis* Berliner. This followed its commercial production and use on a large scale (Heimpel *et al.*, 1960) for the control of various agricultural pests. The disadvantage of this biocide, however, was that it was a general insecticide and had very little species-specificity. Besides being effective against a number of harmful insects this was found to be toxic to many beneficial insects including the silkworm, which restricted its use in the sericultural regions. The search continued for a selective biocide and some samples collected in Israel (Goldberg and Margalit, 1977 ; Yousten, 1984) were found to be highly toxic against certain pests but harmless to others. The formulation of this biocide, *B. thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac was found to be a highly toxic mosquito larvicide (Goldberg and Margalit, *op. cit.* ; Gracia and Das Rochers, 1979 ; Davidson *et al.*, 1981) but safe to a vast majority of non-target insects (Mulla *et al.*, 1982). This formulation of *B. thuringiensis israelensis* H₁₄ thus became a highly potential microbial agent sponsored by the WHO for the control of malaria and filaria. In the light of this biocide being used on a large scale, it was considered necessary to ascertain whether the silkworms, *Antheraea mylitta* and *Bombyx mori*, are susceptible to it and hence this study.

Present address : Director, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

MATERIALS AND METHODS

The commercial preparation of *B. thuringiensis* used in this study was, *Bacillus thuringiensis* H₁₄ sero var. *israelensis* de Barjac. Altogether three samples of the serotypes were used.

i. ABG-6108 wettable powder (Abott for WHO) 1500 IU/mg.

ii. VCRC (Pondicherry, India) 800 IU/mg.

iii. Moskitur (Czechoslovakia) 1500 IU/mg.

These three samples were received with the courtesy of Dr J. Weiser, Head of the Department of Insect Pathology and Biological Control, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.

The three samples were diluted in distilled water and solutions at concentrations of 1 %, 0.5 % and 0.1 % were prepared for the test.

The tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*, (race Sukinda) and mulberry silkworm, *Bombyx mori*, (race Nistari) were reared. The silkworms were subjected to pathogenicity test at all the five instars in both cases. The leaves of the respective food plants were smeared with the pathogen and fed to the larvae of the two silkworms 24 hr after hatching/moulting. While in the case of *A. mylitta*, batches of 100 worms each replicated three times were used for each of the treatments, in the case of *B. mori*, batches of 20 larvae each replicated three times were considered for each of the treatments. In contrast to *B. mori*, only first and second instar larvae of *A. mylitta* were treated indoors. The treatments of III-V instar larvae were conducted outdoors on bush plantations of *T. arjuna*. To avoid loss by pests during outdoor rearings, the larvae were reared under nylon nets. After treatment, each of the dead worms was collected and examined microscopically for identifying the cause of the mortality.

RESULTS AND DISCUSSION

Symptomatology :

Within a couple of hours after feeding the pathogen along with the food, the pathogenic effect was very much vivid on the early instar larvae of both silkworm varieties. The treated larvae became sluggish, lost their appetite and grip on the branches and started falling. After that, they became completely paralysed and died. On death, they turned blackish and putrefied.

In the case of *B. mori*, the larvae became completely inactive and paralysed. Paralysis of the body has also been observed by earlier workers on *B. mori* and *A. pernyi* with the administration of other serotypes of the biocide. The causes for this phenomenon have been attributed to the crystalline toxic protein produced by the bacteria (Heimpel and Angus, 1960 ; Smirnov and Berlinget, 1966). These investigations have suggested that the action of the toxin might involve a breakdown of the cell-cementing substance in the midgut to diffuse into the blood, thus raising the pH of the blood and causing general paralysis of the body. The onset of this paralysis was closely related to disruption of the skeletal muscle (Singh *et al.*, 1986).

Comparative toxicity of the three samples :

The data corresponding to the pathogenicity test of *B. thuringiensis* var. *israelensis* H₁₄ on *A. mylitta* and *B. mori* have been statistically analysed and are presented in Tables I to V.

Among the three samples of the biocide, it was observed that the sample ABG-6108 is maximum pathogenic followed by VCRC-Pondicherry and Moskitur, Czechoslovakia. The data clearly indicated a highly significant difference in the mortality rate in the treated lots over controls (Tables I, IV and V). The activity differential of the various formulations noted in the present experiment was also observed by other workers (Mulla *et al.*, 1980 ; Ali, 1981).

Further, with higher concentrations, the pathogen was more effective (Table II). This is obvious from the fact that the mortality rate of the hosts in formulations with a higher concentration of the pathogen was significantly higher than those in the lower concentrations. The data presented in Table III clearly indicate that in the case of *A. mylitta*, the maximum mortality (18.33-100 %) was observed when the 1 % solution of sample ABG-6108 was used and minimum mortality (10.67-57.67 %) was recorded when the 0.1 % solution of the sample Moskitur was used. In the case

of *B. mori* too, the effectiveness of the three samples are on similar lines. In this case, treatment of only higher dosage of ABG-6108 on first instar larvae was found completely lethal.

Table I. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *A. mylitta* and *B. mori*. Mean mortality percentage*.

Tableau I. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* chez *A. mylitta* et *B. mori*. Pourcentage moyen de mortalité*.

Instars / sources	<i>A. mylitta</i>					<i>B. mori</i>				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Age / sources	<i>A. mylitta</i>					<i>B. mori</i>				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
A	(90.00) 100.00	(90.00) 100.00	(59.83) 74.34	(45.58) 51.00	(26.36) 19.79	(77.39) 93.89	(51.30) 60.56	(42.29) 45.56	(33.08) 30.56	(27.63) 22.78
B	(47.42) 49.56	(44.81) 49.67	(46.68) 42.34	(47.04) 53.56	(28.43) 22.78	(40.11) 41.67	(30.40) 27.23	(17.41) 10.67	(11.98) 4.45	(7.14) 0.56
C	(50.93) 60.11	(47.69) 51.23	(40.91) 42.89	(43.82) 48.00	(22.60) 15.11	(26.47) 20.56	(19.68) 12.23	(12.70) 5.00	(8.59) 1.67	(7.14) -
SE ± (mean / moyenne)	1.08	0.82	0.65	-	0.86	1.37	1.77	1.64	1.07	1.12
CD at 5 %	3.19	2.41	1.91	-	2.53	4.04	5.22	4.84	3.15	3.30

* On a transformed scale / Valeurs transformées.

Figures in parentheses are in degrees / Les chiffres entre parenthèses expriment des degrés.

A = ABC-6108 (WHO).

B = VCRC (Pondicherry).

C = Moskitur (CZE).

SE = Standard error / Ecart type.

Susceptibility at different instars on the silkworm :

A perusal of the data in Tables I to V shows that early instar larvae are more susceptible than the advanced age larvae. The mortality rate in the early instar larvae is significantly higher than those in the advanced age larvae. During the course of treatment, it was found that nearly 30-40 % of the early instar larvae in the case of *A. mylitta* had died within 24 hr and the whole lot was finished within 7-10 days' time. A comparatively higher susceptibility of the early instar larvae is also evident from the fact that while cent per cent mortality was recorded in the first and second instar larvae of *A. mylitta* in all the concentrations of sample ABG-6108, there was only 18.33-21 % loss in the final instar

larvae. In *B. mori* also, while there was 13.33-100 % mortality in the first instar larvae, there was only 0-38.33 % loss in the final instar. In fact, only higher dosage of ABG-6108 was found to be fatal in the first instar larvae. From the second instar onwards, the rate of mortality gradually decreased and the fifth instar larvae had no effect of the samples VCRC, Pondicherry and Moskitur, Czechoslovakia. Further, in advanced age larvae, the process was not so severe and the rate of mortality gradually reduced.

Table II. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *A. mylitta* and *B. mori*. Mean mortality percentage*.

Tableau II. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* chez *A. mylitta* et *B. mori*. Pourcentage moyen de mortalité*.

Instars / concentrations	<i>A. mylitta</i>					<i>B. mori</i>				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Age / concentrations	<i>A. mylitta</i>					<i>B. mori</i>				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
1 %	(64.90) 75.00	(63.14) 72.12	(51.58) 60.67	(48.78) 56.56	(27.25) 21.11	(54.33) 61.10	(40.24) 43.89	(28.29) 25.00	(20.11) 13.89	(14.00) 6.67
0.5 %	(61.48) 69.22	(59.98) 64.56	(52.36) 51.56	(47.43) 54.22	(25.24) 18.45	(48.99) 52.22	(31.51) 29.45	(23.35) 21.78	(19.12) 15.01	(17.01) 12.78
0.1 %	(61.98) 65.45	(60.39) 64.22	(43.47) 47.34	(40.22) 32.89	(24.91) 18.12	(40.45) 42.78	(29.62) 26.67	(20.76) 14.45	(14.41) 7.78	(10.91) 3.89
SE ± (mean / moyenne)	-	0.82	0.65	0.95	-	1.37	1.77	1.64	1.07	1.12
CD at 5 %	-	2.41	1.91	2.8	-	4.04	5.22	4.84	3.15	3.30

* On a transformed scale / Valeurs transformées.

SE = Standard error / Ecart type.

Higher susceptibility at early stages has also been observed in the case of *Culex pipiens* where first instar larvae have been found to be four times more susceptible to the biocide than last instar (WHO, VBC, 77.750). Molly *et al.* (1981), working on the black fly, reported the same phenomenon. The varying degree of susceptibility, which was observed in the present study with *A. mylitta* and *B. mori*, was also observed by Shaikh and Morrison (1966) and Aly (1985) who, working on nine test insects, observed the same thing. Moreover, unlike classical biocontrol agents, which are characterised by their ability to recycle in the host and to suppress host populations over time, this pathogen is unable to establish high and lasting infections among natural mosquito populations (Ramoska *et al.*, 1981 ; Vankova, 1982). However, the requirement of frequent applications of this agent limits its scope (Service, 1983).

Table III. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *A. mylitta* and *B. mori*. Mean mortality percentage*. Interaction.

Tableau III. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* chez *A. mylitta* et *B. mori*. Pourcentage moyen de mortalité*. Interaction.

Instars / interaction	<i>A. mylitta</i>					<i>B. mori</i>				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Age / interaction	<i>A. mylitta</i>					<i>B. mori</i>				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
AC ₁	(90.00) 100.00	(90.00) 100.00	(63.97) 80.67	(45.57) 51.00	(25.27) 18.33	(83.58) 100.00	(59.06) 73.33	(46.92) 53.33	(33.00) 30.00	(24.81) 18.33
AC ₂	(90.00) 100.00	(90.00) 100.00	(62.54) 78.67	(47.50) 54.33	(26.54) 20.00	(83.58) 100.00	(50.79) 60.00	(48.88) 56.67	(40.20) 41.67	(38.19) 38.33
AC ₃	(90.00) 100.00	(90.00) 100.00	(52.97) 63.67	(43.66) 47.67	(27.27) 21.00	(65.00) 81.67	(44.04) 48.43	(31.07) 26.67	(20.07) 20.00	(19.89) 11.67
BC ₁	(48.65) 56.33	(48.27) 55.67	(49.02) 57.00	(50.77) 60.00	(29.07) 23.67	(46.92) 43.33	(43.08) 46.67	(21.34) 13.33	(16.60) 8.33	(8.59) 1.67
BC ₂	(49.03) 43.00	(43.46) 47.33	(36.86) 36.00	(40.16) 41.67	(28.40) 22.67	(35.22) 33.33	(28.24) 23.33	(20.45) 13.33	(10.75) 3.33	(6.42) -
CC ₁	(56.04) 68.67	(51.16) 60.67	(41.75) 44.33	(50.01) 58.67	(27.41) 21.33	(33.08) 30.00	(18.59) 11.67	(16.60) 8.33	(10.75) 3.33	(8.59) -
CC ₂	(49.85) 58.33	(44.23) 47.67	(40.39) 42.00	(44.61) 49.33	(21.33) 13.33	(25.19) 18.33	(23.85) 16.67	(10.75) 3.33	(8.59) 1.67	(6.42) -
CC ₃	(46.92) 53.33	(47.69) 45.33	(40.59) 42.33	(36.85) 36.00	(19.05) 10.67	(21.15) 13.33	(16.60) 8.33	(10.75) 3.33	(6.42) -	(6.42) -
SE mean ± <i>Ecart type de la moyenne</i> ±	1.87	-	1.12	1.65	1.48	2.37	3.06	2.84	1.85	1.94
CD at 5 %	5.52	-	3.31	4.86	4.38	7.00	9.04	8.38	5.45	5.72

* On a transformed scale / Valeurs transformées.

Table IV. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *A. mylitta* and *B. mori*. Treatment vs control.

Tableau IV. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* chez *A. mylitta* et *B. mori*. Comparaison entre les groupes traités et témoins.

Treatment vs control	<i>A. mylitta</i>					<i>B. mori</i>				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
<i>Groupes traités et témoins</i>	<i>A. mylitta</i>					<i>B. mori</i>				
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>
Treatment <i>Traitement</i>	(62.79) 69.89	(60.39) 66.97	(49.13) 53.19	(45.48) 50.86	(25.80) 19.23	(47.99) 52.04	(33.79) 33.34	(24.13) 20.41	(17.89) 10.23	(13.97) 7.23
Control <i>Témoin</i>	(32.53) -	(32.13) -	(29.32) -	(27.13) -	(21.58) -	(8.59) 1.67	(6.42) -	(8.59) 1.67	(6.42) -	(6.42) -
SE diff. <i>Ecart type diff.</i>	1.97	1.49	1.18	1.74	1.56	2.50	3.23	2.99	1.95	2.04
CD at 5 %	4.12	3.11	2.46	3.62	3.26	5.22	6.74	6.24	4.06	4.26

Table V. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *A. mylitta* and *B. mori*. Analysis of variance.Tableau V. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* chez *A. mylitta* et *B. mori*. Analyse de variance.

Source of variation	DF	<i>A. mylitta</i> Mean sum of squares at different instars					<i>B. mori</i> Mean sum of squares at different instars				
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Source de variation	DF	<i>A. mylitta</i> Somme moyenne des carrés					<i>B. mori</i> Somme moyenne des carrés				
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
S	2	5026.18 **	5759.55 **	846.05 **	23.28	78.80 **	6251.73 **	2326.63 **	2275.12 **	1586.19 **	1259.39 **
C	2	30.60 NS	40.40 **	218.00 **	190.50 **	14.53 NS	452.29 **	288.65 **	131.66 *	83.54 **	83.75 **
S × C	4	26.28 *	11.46	63.73 **	29.24 *	22.89 *	57.22 *	168.44 **	149.43 **	65.89 **	97.35 **
T vs cl	1	2472.43 **	2224.48 **	1060.36	908.74 **	48.03	4192.00 **	2023.06 **	652.56 **	354.9 **	153.98 **
Errors Ecart	20	10.51	6.02	3.77	8.14	6.61	10.61	28.16	24.19	10.24	11.28

Figures on a transformed scale / Les chiffres expriment des valeurs transformées.

NS : Not significant / Non significatif.

DF : Degree of freedom / Degré de liberté.

S : Sources / Echantillons.

C : Concentrations.

T vs cl : Treatment versus control / Traité contre témoins.

* Significant at 5 % level of significance / Significatif au seuil de 5 %.

** Significant at 1 % level of significance / Significatif au seuil de 1 %.

Thus it is evident that, though *B. thuringiensis* var. *israelensis* H₁₄ has been reported to be highly effective against mosquitoes but ineffective against the majority of lepidopterans, this does not hold good for *A. mylitta* and *B. mori*. Furthermore, while there are no records as yet of mosquito resistance to *B. thuringiensis israelensis*, insect resistance to a strain of *B. thuringiensis* has already been reported (McGaughey, 1985). The results are thus in conformity with the findings of Ignoffo *et al.* (1981), who obtained similar results with *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea* and *Heliothis virescens*.

REFERENCES

- ALI A. (1981) *Bacillus thuringiensis* Sero Var. *israelensis* (ABG-6108) against Chironomids and some non-target aquatic invertebrates. J. Invertebr. Pathol., 38, 264-272.

- ALY C. (1985) Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores in the gut of *Aedes* larvae (Diptera : Culicidae). J. Invertebr. Pathol., 45(1), 1-8.
- GOLDBERG L., MARGALIT J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquitoes News, 37, 355-358.
- HEIMPEL A.M., ANGUS T.A. (1960) Bacterial insecticides. Bacteriol. Rev., 24, 266-288.
- IGNOFFO C.M., COUCH T.L., GRACIA C., KRONN M.J. (1981) Relative activity of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea* and *Heliothis virescens*. J. Eco. Entomol., 74, 218-222.
- McGAUGHEY W.H. (1985) Insect resistance to the biological insecticide, *Bacillus thuringiensis*. Science, 229, 193-195.
- MOLLY D., GANGLER R., HUGO J. (1981) Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. J. Eco. Entomol., 74, 61-64.
- MULLA M.S., FEDERICI B.A., DARWAZEH H.A. (1982) Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against water mosquitoes and its effect on non-target organisms. Environ. Entomol., 11, 788-796.
- RAMOSKA W., PACEY C., WATTS S. (1981) Tests on the pathogenicity and persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype H-14) and *Bacillus sphaericus* Neide against larvae of *Culex restuans* Theobald. J. Kansas Entomol. Soc., 54, 56-60.
- SERVICE M. (1983) Biological control of mosquitoes. Has it a future ? Mosquitoes News, 43, 113-120.
- SHAIKH M.V., MORRISON F.O. (1966) Susceptibility of nine insect species to infection of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol., 8, 347-350.
- SINGH G.J.P., SCHOUEST L.P. Jr, GILL S.S. (1986) Action of *Bacillus thuringiensis* sub-sp. *israelensis* and endotoxin on the ultrastructure of the housefly larvae neuromuscular system *in vitro*. J. Invertebr. Pathol., 47(2), 155-166.
- SMIRNOFF W.A., BERLINGNET L. (1966) A substance in some commercial preparations of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* toxic to sawfly larvae. J. Invertebr. Pathol., 8, 376-381.
- YOUSTEN A.A., MADHEKAR N., WALLIS D. (1984) Fermentation conditions affecting growth, sporulation and mosquito larval toxin formation by *Bacillus sphaericus*. Dev. Ind. Microbiol., 25, 757-762.

TOXICITE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* SEROTYPE H₁₄ CHEZ *ANTHERAEA MYLITTA* D. ET *BOMBYX MORI* L.

U.P. GRIYAGHEY & K. SENGUPTA*

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi - 834 005, Bihar, Inde.

La toxicité de trois échantillons de Bacillus thuringiensis H₁₄, var. israelensis de Barjac, a été étudiée chez Antheraea mylitta et Bombyx mori. Trois concentrations de chacun des échantillons du biocide ont été testées à tous les âges larvaires chez ces deux espèces de vers à soie. Sur les trois échantillons du biocide, ABG-6108 est le plus toxique, suivi de VCRC, Pondicherry et Moskitur (Tchécoslovaquie).

INTRODUCTION

Le développement, chez les insectes parasites, de la résistance à certains insecticides et les risques liés à l'utilisation continue de divers insecticides chimiques ont conduit à une recherche intensive de méthodes alternatives de lutte contre les insectes au cours de ces dernières décennies. L'un des agents de lutte biologique les plus prometteurs est la bactérie sporogène facultative, *Bacillus thuringiensis*. La souche originale de *Bacillus* utilisée dans la lutte contre les parasites de récoltes a d'abord été *B. thuringiensis* Berliner. Ceci faisait suite à sa production commerciale et à son utilisation à grande échelle (Heimpel et coll., 1960) dans la lutte contre divers parasites de récoltes. Cependant, l'inconvénient de ce biocide résidait dans le fait qu'il s'agissait d'un insecticide général n'ayant pratiquement pas de spécificité à une espèce donnée. Non seulement efficace pour un grand nombre d'insectes nuisibles, il était également toxique pour de nombreux insectes d'intérêt économique, dont le ver à soie, ce qui limitait son utilisation dans les régions séricicoles. Les recherches ont été poursuivies pour obtenir un biocide sélectif et certains échantillons prélevés en Israël (Goldberg et Margalit, 1977 ; Yousten, 1984) se sont révélés très toxiques pour certains parasites mais inoffensifs pour d'autres. La formulation de ce biocide, *B. thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac, s'est révélée être un larvicide très toxique chez le moustique (Goldberg et Margalit, *op. cit.* ; Gracia et Das Rochers, 1979 ; Davidson et coll., 1981) mais inoffensive pour une vaste majorité d'insectes non ciblés (Mulla et coll., 1982). Cette formulation de *B. thuringiensis israelensis* H₁₄ est ainsi devenue un agent microbien à fort potentiel cautionnée par l'OMS (Organisation mondiale pour la santé) pour la lutte contre la malaria et la filaire. Ce biocide étant utilisé à grande échelle, on a jugé nécessaire d'entreprendre une étude afin de déterminer s'il était toxique pour les vers à soie *Antheraea mylitta* et *Bombyx mori*.

*Adresse actuelle : Directeur, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, Inde.

MATERIELS ET METHODES

La préparation commerciale de *B. thuringiensis* utilisée dans cette étude est la variété *Bacillus thuringiensis* sérotype H₁₄ var. *israelensis* de Barjac. Au total, trois échantillons de ce sérotype ont été utilisés :

- 1) ABG, 6108 poudre humectable (Abott pour OMS) 1500 ui/mg.
- 2) VCRC (Pondicherry, Inde) 800 ui/mg.
- 3) Moskitur (Tchécoslovaquie) 1500 ui/mg.

Ces trois échantillons ont été fournis gratuitement par le Dr J. Weiser, Chef du Département de Pathologie des Insectes et de Lutte biologique, Académie des Sciences de Tchécoslovaquie, Prague.

Les trois échantillons ont été dilués dans de l'eau distillée et des solutions aux concentrations de 1 %, 0,5 % et 0,1 % ont été préparées pour cette expérience.

Le ver à soie tassar tropical *Antheraea mylitta* (race Sukinda) et le ver à soie du mûrier *Bombyx mori* (race Nistari) ont été choisis pour cette étude. Les vers à soie des deux races ont été soumis au test de pathogénicité à tous les âges larvaires. Les feuilles des plantes nourricières des larves ont été enduites avec l'agent pathogène puis données en nourriture aux larves des vers à soie des deux races 24 heures après l'éclosion ou la mue. Pour chaque traitement, on a utilisé des lots de 100 larves répliqués trois fois dans le cas d'*A. mylitta* et des lots de 20 larves répliqués trois fois dans le cas de *B. mori*. Contrairement aux lots de *B. mori*, seules les larves des 1^{er} et 2^e âges d'*A. mylitta* ont été traitées dans la pièce d'élevage. Les traitements des larves du 3^e au 5^e âge ont été réalisés en extérieur sur des plantations en buisson de *T. arjuna*. Afin d'éviter la perte due aux prédateurs pendant les élevages en extérieur, l'élevage des larves a été réalisé sous des filets en nylon. Après le traitement, toutes les larves mortes ont été prélevées et examinées au microscope afin de déterminer la cause de la mortalité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Symptomatologie :

Deux à trois heures après le nourrissage avec l'agent pathogène, l'effet pathogénique apparaît sur les larves des premiers âges chez les deux variétés de vers à soie. Les larves traitées deviennent molles, perdent l'appétit, n'ont plus de prise sur les branches et commencent à tomber. Ensuite, elles se sclérosent totalement et meurent. Les larves mortes ont un aspect noirâtre et putréfié.

Dans le cas de *B. mori*, les larves présentent une inertie totale et sont paralysées. Cette paralysie a déjà été observée par d'autres chercheurs sur *B. mori* et *A. pernyi* après administration d'autres sérotypes de ce biocide. Les causes de ce phénomène ont été attribuées à une protéine toxique cristalline produit par les bactéries (Heimpel et Angus, 1960 ; Smirnoff et Berlinget, 1966). Dans ces études, il a été suggéré que l'action de la toxine pourrait entraîner une détérioration de la substance consolidant les cellules dans l'intestin moyen qui diffuserait dans le sang, augmentant ainsi le pH du sang et provoquant une paralysie générale. Le début de cette paralysie a été mis en relation étroite avec la rupture du muscle squelettique (Singh et coll., 1986).

Toxicité comparative des trois échantillons :

Les données correspondant au test de la pathogénicité de *B. thuringiensis* var. *israelensis* H₁₄ chez *A. mylitta* et *B. mori* ont été analysées statistiquement et sont présentées dans les tableaux I à V.

Sur les trois échantillons du biocide, on a observé que l'échantillon ABG-6108 est le plus toxique, suivi de VCRC-Pondicherry et Moskitur-Tchécoslovaquie. Les données font clairement apparaître une différence significative du taux de mortalité entre les lots traités et les lots témoins (Tableaux I, IV et V). Le différentiel d'activité des diverses formulations observé dans cette expérience a également été observé par d'autres chercheurs (Mulla et coll., 1980 ; Ali, 1981).

De plus, l'agent pathogène est plus efficace à des concentrations supérieures (Tableau II). Ceci est clairement démontré par le fait que le taux de mortalité chez les hôtes ayant reçu des formulations contenant une concentration supérieure de l'agent pathogène est significativement plus élevé que celui des hôtes ayant reçu des formulations contenant des concentrations plus faibles. Les données

présentées dans le tableau III montrent clairement que, dans le cas d'*A. mylitta*, on obtient la mortalité maximale (18,33 à 100 %) avec la solution à 1 % de l'échantillon ABG-6108 et la mortalité minimale (10,67 à 57,67 %) avec la solution à 0,1 % de l'échantillon Moskitur. Dans le cas de *B. mori*, l'efficacité des trois échantillons suit des tendances similaires. Dans ce cas, seul le traitement avec une dose supérieure de ABG-6108 sur les larves du premier âge est totalement létal.

Sensibilité du ver à soie aux différents âges larvaires :

La lecture des données présentées dans les tableaux I à V montre que les larves des premiers âges sont plus sensibles que les larves d'un âge avancé. Le taux de mortalité chez les larves des premiers âges est significativement plus élevé que celui observé chez les larves âgées. Au cours du traitement, on a observé que près de 30 à 40 % des larves des premiers âges d'*A. mylitta* sont mortes en 24 heures et que la totalité du lot mourait en 7 à 10 jours. La sensibilité comparativement plus élevée des larves des premiers âges est également évidente du fait que l'on enregistre une mortalité de 100 % chez les larves d'*A. mylitta* au 1^{er} et au 2^e âge pour toutes les concentrations de l'échantillon ABG-6108 contre seulement 18,33 à 21 % de perte chez les larves des derniers âges. Chez *B. mori* également, on observe une mortalité de 13,33 à 100 % chez les larves du premier âge contre 0 à 38,33 % chez les larves des derniers âges. En fait, seule la dose supérieure de ABG-6108 est fatale pour les larves des premiers âges. A partir du deuxième âge, le taux de mortalité décroît progressivement et les larves du cinquième âge ne sont pas affectées par les échantillons VCRC, Pondicherry et Moskitur-Tchécoslovaquie. De plus, chez les larves d'un âge avancé, le processus n'est pas si marqué et le taux de mortalité diminue progressivement.

Cette sensibilité plus forte chez les premiers âges a également été observée chez *Culex pipiens* ; les larves du premier âge de cet insecte sont quatre fois plus sensibles au biocide que celles du dernier âge (OMS, VBC, 77,750). Molly et coll. (1981) ont observé le même phénomène chez la mouche noire. La variation du degré de sensibilité, observée dans cette étude chez *A. mylitta* et *B. mori*, a également été relevée par Shaikh et Morrison (1966) et Aly (1985) chez neuf insectes testés. De plus, à la différence des agents de lutte biologique classiques, qui se caractérisent par leur capacité à se recycler dans leur hôte et à éliminer les populations hôtes sur un laps de temps assez long, cet agent pathogène n'est pas capable d'établir des infestations fortes et durables chez les populations naturelles de moustiques (Ramoska et coll., 1981 ; Vankova, 1982). Le fait qu'il soit nécessaire de répéter souvent les applications de cet agent limite son action (Service, 1983).

Bien qu'il ait été établi que, si *B. thuringiensis* var. *israelensis* H₁₄ est très efficace contre les moustiques, il est inoffensif pour la majorité des lépidoptères, ceci est inexact pour *A. mylitta* et *B. mori*. De plus, même si la résistance des moustiques à *B. thuringiensis israelensis* n'a pas encore été établie, on a observé la résistance d'autres insectes à une souche de *B. thuringiensis* (McGaughey, 1985). Nos résultats confirment donc ceux d'Ignoffo et coll. (1981), qui ont obtenu des résultats similaires avec *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea* et *Heliothis virescens*.

EVALUATION OF TECHNIQUES FOR SCREENING FOR DROUGHT RESISTANCE IN MULBERRY

B.N. SUSHEELAMMA, J.S. KUMAR, T. MOGILI, K. SENGUPTA, M.N. PADMA & N. SURYANARAYANA

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

Three techniques, viz. leaf diffusive resistance, leaf temperature and drying rate of excised leaves were evaluated for screening for drought resistance in 36 mulberry F₁ hybrids under rainfed (stress) and irrigated (non-stress) conditions. Leaf yields under rainfed and irrigated conditions were used to characterise the drought resistance in F₁ hybrids. Neither diffusive resistance measurements nor leaf temperature were suitable screening techniques, since difference between cultivars were not detected. There were marked differences in the diffusive resistance, leaf temperature and excised leaf water loss rate between the rainfed and the irrigated environments. Between hybrids, a difference was detected only for excised leaf water loss rate. Among the different F₁ hybrids evaluated for water retention capacity after 24 hours of excision, S-20 and S-23 had the best water retention and these were high yielding hybrids also under rainfed conditions. Excised leaf water retention capability measurement was the most promising among the three techniques evaluated.

Keywords : Diffusive resistance, water retention, excised leaves.

INTRODUCTION

Many techniques have been used to indicate water stress intensity in wheat leaves. These include, gravimetric techniques to measure the leaf water content or saturation deficit (Dedio, 1975), diffusive resistance (Jones, 1977), water potential (Kaul, 1969) and leaf temperature (Ehrler *et al.*, 1978). To be useful in screening programmes for breeding for improved drought resistance, methods of assessing water stress must be rapid enough to screen a relatively large number of lines and accurate enough to detect real genotypic differences. Fischer *et al.* (1977) suggested that at least 10 readings of diffusive resistance per genotype with a stomatal porometer are needed to detect genotype differences in wheat because of a high standard deviation. Assessment of the water loss rate from excised leaves of plants has shown some promise for differentiating drought resistance of wheat cultivars. Bayles *et al.* (1937) found a difference between spring wheat cultivars in the rate at which excised plants lost water. Excised plants of drought resistant wheat cultivars lost water more slowly than less resistant cultivars (Sandhu and Laude, 1958). Salim *et al.* (1969) found that drought-hardy wheat cultivars had a better water retention in excised leaves than did less hardy cultivars.

Adjei and Kirkham (1980) found that a drought resistant cultivar had a higher stomatal resistance than a drought sensitive cultivar in the growth cycle. Shimshi and Ephrat (1975) found that leaf diffusive resistance was negatively correlated with yield. A lower leaf water potential resulted in an increased leaf temperature. Similarly, water stress has been shown to result in a higher leaf temperature in cotton (Ehrler, 1973) and oats (Sandhu and Harton, 1978).

In any breeding programme, it is desirable to have some simple quick means of identifying desired characteristics. A number of researchers have suggested that there is a correlation between drought hardiness and water retention of leaves or other plant parts, when the latter are exposed to

desiccation (Sandhu and Laude, 1958 ; Ponomerev and Panchenko, 1960 ; Dedio, 1975 ; Clarke and McCaig, 1982). The mulberry breeding programmes so far carried out are based on selection for yield by itself rather than physiological characters which control yield (Donald, 1968). Therefore, the objective of this investigation is to evaluate physiological methods or techniques which mulberry breeders can use to screen cultivars or hybrids for drought resistance.

MATERIALS AND METHODS

Thirty-six F_1 hybrids obtained from mass selection were grown in the field from 1987 to 1989 under both rainfed and irrigated conditions. The experiment was arranged in a lattice design of 6×6 with four replications in each hybrid. Pits measuring $45 \text{ cm} \times 45 \text{ cm} \times 45 \text{ cm}$ were prepared under both environments. The pits were filled with farmyard manure, soil and sand in 1:1:1 proportion. Six-month-old saplings of the 36 hybrids were planted during June 1987 under rainfed and irrigated conditions with $90 \text{ cm} \times 90 \text{ cm}$ spacing. Each experimental plot had border plants to eliminate the border effect. Two prunings were given, the first in the month of June 1988 at a height of 30 cm from the ground level and the second pruning in the last week of October 1988 at a height of 100 cm from the ground level. Farmyard manure was applied at the rate of 20 tons/hectare/year and N:P:K was applied at the rate of 120:50:50 kg/hectare/year. Irrigation was provided once in 15 days to the irrigated plots at the rate of 22,687.5 gallons of water per acre ($254 \text{ m}^3/\text{ha}$). The rainfed plots were cultivated just under natural rains (stress condition).

Five leaf harvests were recorded in a year (all data not given, only the average of two years' summer season leaf yield data are presented). The leaf temperature and leaf diffusive resistance were measured using LICOR LI-1600 Steady State Porometer. Measurements were recorded after 60 days of the fourth leaf harvest between 12 and 14 hours from all the four replications of stress and non-stress plots. For evaluation of the water content in excised leaves, 100 fully matured leaves were collected at 9 a.m. in a plastic bag during the month of April and brought to the laboratory conditions in a controlled environment of 36°C and 50 % relative humidity. After 7 hours and 24 hours of excision, leaf weights were recorded. The leaves were kept in an oven for drying at 80°C for three days and the dry weight of the leaves was recorded. The water content of the leaves after 7 hours and 24 hours of excision from the plant was calculated by gravimetric method.

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf yield performance :

The yield performance of the F_1 hybrids differed under rainfed (stress) and irrigated (non-stress) environments (Table I). Out of the 36 hybrids evaluated for leaf yield, S-20 and S-23 gave the highest yields, whereas S-19 gave a very low yield under both environments. A very good adaptation to dry environment is indicated in S-20 hybrid, which had a higher yield under stress condition compared to the other F_1 hybrids during the stress period (summer season).

Leaf diffusive resistance :

In different F_1 hybrids, the difference in leaf diffusive resistance was very small in comparison to the sampling error and genotype difference (Table I). Consequently, this was unsuitable for screening purpose in a breeding programme. Further, there was no relationship between leaf yield and leaf diffusive resistance (Table II). This is in consistence with the findings of Fischer and Wood (1979) in spring wheat cultivars, wherein they observed a negative correlation between leaf yield and diffusive resistance. However, there was a significant difference between diffusive resistance of the leaves of rainfed and irrigated environments (Table I).

Leaf temperature :

The leaf temperature of the 36 F_1 hybrids did not differ significantly at any time of sampling (Table I). A difference in the leaf temperature was found between rainfed and irrigated environments (Table II). Under water stress condition, the leaf temperature was higher compared to non-stress

Table I. Leaf yield, leaf diffusive resistance, leaf temperature and leaf water content after 7 and 24 hours of excision in 36 F₁ hybrids under stress and non-stress environments.

Tableau I. Rendement en feuilles, résistance à la diffusion, température et contenu en eau des feuilles 7 heures et 24 heures après la coupe chez 36 hybrides F₁ dans des conditions de stress et d'irrigation.

F ₁	Leaf yield (kg)		Leaf diffusive resistance ± SE (cm)		Leaf temperature ± SE (°C)		Leaf water content after 7 hrs of excision ± SE (%)		Leaf water content after 24 hrs of excision ± SE (%)	
	Stress	Non-stress	Stress	Non-stress	Stress	Non-stress	Stress	Non-stress	Stress	Non-stress
<i>F₁</i>	<i>Rendement en feuilles (kg)</i>		<i>Résistance à la diffusion des feuilles ± SE (cm)</i>		<i>Température des feuilles ± SE (°C)</i>		<i>Contenu en eau des feuilles 7 h après la coupe ± SE (%)</i>		<i>Contenu en eau des feuilles 24 h après la coupe ± SE (%)</i>	
	<i>Stress</i>	<i>Irrigation</i>	<i>Stress</i>	<i>Irrigation</i>	<i>Stress</i>	<i>Irrigation</i>	<i>Stress</i>	<i>Irrigation</i>	<i>Stress</i>	<i>Irrigation</i>
S-1	0.725	2.063	1.87 + 0.45	1.47 + 0.35	32.06 + 1.36	30.80 + 1.41	65.69 + 1.59	71.35 + 0.49	51.50 + 1.88	64.61 + 0.89
S-2	0.663	1.563	2.09 + 0.62	1.49 + 0.32	33.06 + 0.50	29.93 + 0.95	61.30 + 0.84	66.30 + 0.74	47.19 + 1.15	53.92 + 1.01
S-3	0.175	1.225	1.35 + 0.14	1.08 + 0.10	31.10 + 0.96	30.13 + 0.77	60.96 + 1.22	66.64 + 0.81	47.19 + 1.34	54.04 + 1.67
S-4	0.688	1.788	2.37 + 0.76	1.59 + 0.26	32.05 + 0.07	29.93 + 1.02	62.35 + 1.45	68.12 + 0.88	47.47 + 1.16	59.26 + 1.36
S-5	0.363	1.175	2.67 + 0.29	1.46 + 0.18	32.18 + 0.83	30.40 + 0.63	59.50 + 1.49	67.50 + 0.99	42.09 + 0.33	57.65 + 1.20
S-6	0.513	1.263	1.52 + 0.18	1.07 + 0.09	33.76 + 1.10	30.30 + 8.16	61.83 + 0.77	69.20 + 0.57	49.94 + 1.09	59.07 + 1.01
S-7	0.450	0.988	2.02 + 0.17	1.35 + 0.24	32.20 + 0.62	30.36 + 0.72	58.78 + 1.14	41.75 + 1.42	41.75 + 1.42	61.05 + 1.12
S-8	0.263	2.125	1.66 + 0.23	1.56 + 0.31	31.15 + 1.32	29.06 + 0.20	61.36 + 1.45	66.99 + 1.35	43.46 + 0.85	58.04 + 1.10
S-9	0.975	1.363	1.57 + 0.36	0.99 + 0.26	31.06 + 0.85	29.53 + 1.02	62.60 + 1.06	68.06 + 1.01	44.87 + 1.11	59.43 + 0.57
S-10	0.950	1.375	2.68 + 0.61	1.52 + 0.19	31.23 + 1.15	29.80 + 0.60	63.86 + 1.31	68.88 + 1.15	43.15 + 1.49	60.40 + 1.33
S-11	0.650	1.500	2.07 + 0.26	1.31 + 0.28	31.50 + 0.90	29.90 + 0.79	60.74 + 1.00	71.05 + 0.72	41.51 + 0.65	62.75 + 0.99
S-12	0.400	1.763	1.31 + 0.23	1.17 + 0.05	31.46 + 0.75	30.00 + 0.84	60.26 + 1.34	69.97 + 1.00	47.54 + 0.90	59.85 + 1.34
S-13	0.313	1.300	1.62 + 0.19	1.12 + 0.12	31.30 + 0.76	30.12 + 0.55	58.16 + 1.32	67.21 + 1.23	38.89 + 1.42	60.67 + 0.88
S-14	0.488	2.000	2.90 + 0.81	1.62 + 0.33	32.20 + 1.22	30.06 + 0.21	62.79 + 0.66	67.13 + 1.55	46.98 + 1.16	57.22 + 0.67
S-15	0.763	2.075	2.06 + 0.19	1.73 + 0.56	31.23 + 1.05	30.30 + 0.75	67.53 + 0.89	71.45 + 0.58	55.95 + 0.70	65.06 + 0.88
S-16	0.263	0.850	2.28 + 0.39	1.37 + 0.24	32.10 + 1.34	30.27 + 1.20	60.63 + 0.84	68.37 + 0.78	50.46 + 0.98	59.61 + 0.70
S-17	0.500	2.275	1.90 + 0.55	1.19 + 0.88	31.13 + 1.30	30.12 + 0.61	67.18 + 0.93	70.09 + 0.81	55.68 + 0.62	62.51 + 0.87
S-18	0.475	2.888	1.95 + 0.15	1.46 + 0.31	31.63 + 1.10	30.35 + 0.77	60.54 + 1.80	66.48 + 0.71	46.44 + 1.61	55.76 + 0.86
S-19	0.500	0.913	1.89 + 0.26	1.21 + 0.27	32.13 + 0.81	30.25 + 0.61	61.36 + 1.07	66.52 + 0.82	46.25 + 0.78	55.50 + 0.94

Continued / Suite page suivante.

Table I. Continued / *Tableau I. Suite.*

F ₁	Leaf yield (kg)		Leaf diffusive resistance $\pm$ SE (cm)		Leaf temperature $\pm$ SE ($^{\circ}$ C)		Leaf water content after 7 hrs of excision $\pm$ SE (%)		Leaf water content after 24 hrs of excision $\pm$ SE (%)	
	Stress	Non-stress	Stress	Non-stress	Stress	Non-stress	Stress	Non-stress	Stress	Non-stress
<i>F₁</i>	<i>Rendement en feuilles (kg)</i>		<i>Résistance à la diffusion des feuilles $\pm$ SE (cm)</i>		<i>Température des feuilles $\pm$ SE ($^{\circ}$C)</i>		<i>Contenu en eau des feuilles 7 h après la coupe $\pm$ SE (%)</i>		<i>Contenu en eau des feuilles 24 h après la coupe $\pm$ SE (%)</i>	
	Stress	Irrigation	Stress	Irrigation	Stress	Irrigation	Stress	Irrigation	Stress	Irrigation
S-20	1.825	3.438	2.20 + 0.21	1.64 + 0.34	33.16 + 0.21	30.03 + 0.75	68.68 + 0.76	68.87 + 1.35	59.54 + 0.58	60.73 + 0.90
S-21	0.363	2.363	2.19 + 0.50	1.03 + 0.17	31.26 + 0.50	30.10 + 0.75	57.30 + 1.35	69.87 + 0.90	41.84 + 1.41	60.59 + 0.99
S-22	0.500	1.813	2.43 + 0.63	1.29 + 0.24	31.56 + 0.35	30.70 + 1.84	56.24 + 1.10	68.70 + 0.70	39.49 + 0.61	57.73 + 0.93
S-23	1.350	2.475	2.49 + 0.97	0.98 + 0.21	31.20 + 0.45	29.90 + 0.65	67.51 + 0.94	71.33 + 0.96	57.49 + 0.95	61.58 + 0.87
S-24	0.963	2.425	2.37 + 0.40	1.37 + 0.41	32.56 + 0.32	29.97 + 0.45	64.69 + 1.03	71.05 + 0.65	57.72 + 1.02	61.34 + 0.68
S-25	0.513	2.300	1.90 + 0.16	1.47 + 0.41	31.60 + 0.65	30.37 + 0.60	60.92 + 1.16	67.51 + 0.60	43.21 + 1.22	60.41 + 0.91
S-26	0.500	3.375	3.53 + 0.26	1.18 + 0.30	32.33 + 0.30	29.97 + 0.73	63.10 + 0.75	70.04 + 0.89	46.68 + 1.20	60.31 + 0.97
S-27	1.125	3.538	2.06 + 0.23	1.09 + 0.16	31.40 + 0.17	30.17 + 0.88	65.48 + 0.78	70.66 + 1.14	54.77 + 1.36	60.36 + 0.55
S-28	0.450	1.825	2.32 + 0.37	1.20 + 0.37	32.16 + 0.47	29.60 + 0.57	60.99 + 1.01	69.72 + 1.02	50.09 + 0.71	61.94 + 1.38
S-29	0.672	2.888	2.17 + 0.15	1.26 + 0.39	32.63 + 0.68	32.63 + 0.68	62.20 + 0.58	67.93 + 0.77	48.79 + 1.56	58.13 + 0.72
S-30	0.512	1.313	1.94 + 0.37	1.01 + 0.27	31.53 + 0.94	30.05 + 0.78	64.43 + 1.49	68.50 + 0.47	53.54 + 1.41	60.73 + 1.15
S-31	0.500	1.988	2.58 + 0.27	1.05 + 0.13	31.55 + 0.69	29.93 + 1.17	59.83 + 0.97	68.52 + 0.83	44.58 + 0.67	59.46 + 0.81
S-32	0.488	2.125	2.59 + 0.33	1.13 + 0.19	32.06 + 0.55	30.20 + 0.96	63.85 + 0.98	69.12 + 1.70	52.19 + 1.66	61.11 + 0.85
S-33	0.950	2.175	2.21 + 0.44	1.49 + 0.27	32.30 + 0.45	30.25 + 0.93	51.56 + 1.16	63.57 + 0.54	41.81 + 0.90	49.74 + 0.69
S-34	0.650	2.125	2.31 + 0.35	1.56 + 0.29	31.76 + 0.25	38.60 + 0.67	52.46 + 0.73	66.12 + 0.84	49.31 + 0.82	67.86 + 0.94
S-35	0.625	2.800	2.23 + 0.47	1.06 + 0.40	31.93 + 0.30	29.95 + 0.49	62.28 + 1.31	69.12 + 0.78	48.77 + 1.17	57.29 + 0.58
S-36	0.125	2.775	2.69 + 0.11	1.43 + 0.36	31.76 + 0.46	30.12 + 0.88	60.04 + 1.37	68.69 + 1.16	45.48 + 0.77	58.30 + 1.17
LSD at 5 %	0.05	0.138	-	-	-	-	0.918	0.978	0.898	0.900
LS	**	**	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**

F₁ : Name of the F₁ hybrid / *Nom de l'hybride F₁.*
 SE : Standard error / *Ecart type.*

LS : Level of significance / *Seuil de signification.*
 NS : Not significant / *Non significatif.*

condition. This is in consistence with the findings of Ehrler (1973) in cotton and Sandhu and Horton (1978) in oats.

Excised leaves :

Among the 36 F₁ hybrids evaluated for water retention capability after 7 and 24 hours of excision from the plant, S-20 and S-23 had the best water retention capability (Table I). Therefore, they were termed drought-hardy hybrids. Hybrid S-13 had a much lower water retention capability after 7 and 24 hours of excision and it was termed non-hardy. This confirms the findings of Sandhu and Laude (1958) and Clarke and McCaig (1982) in wheat cultivars, wherein they observed a superior water retention in leaves of drought-hardy cultivars than in non-hardy cultivars. The leaf water content after 7 and 24 hours of excision from the plant was higher in leaves of irrigated than rainfed environments only during summer (stress period : Table I). But during the rainy season, the leaf water content after 7 and 24 hours of excision was higher in the leaves of rainfed than irrigated environment. This agrees with the results of Salim *et al.* (1969), who found an improved water retention in drought-hardened plants compared to non-hardened plants. The water content of leaves after 24 hours of excision had a significant positive correlation with leaf yield (Table II). The use of the water loss rate from the excised leaf technique in varietal screening is more efficient and effective if drought-hardened or stressed plant material is used.

Table II. Association and correlation of 3 physiological parameters with leaf yield and level of significance in mulberry under stress condition.

Tableau II. Association et corrélation de 3 paramètres physiologiques avec le rendement en feuilles et le seuil de signification chez le mûrier soumis au stress.

Sl no.	Parameters	Correlation	Level of significance
N° de série	Paramètres	Corrélation	Seuil de signification
1	Mean yield vs leaf diffusive resistance	- 0.1199	NS
1	Rendement moyen contre résistance à la diffusion		
2	Mean yield vs leaf temperature	0.093	NS
2	Rendement moyen contre température des feuilles		
3	Mean yield vs leaf water content	0.03174	*
3	Rendement moyen contre contenu en eau des feuilles		

* P < 0.05.

** P < 0.01.

NS : Not significant / Non significatif.

The measurement of excised leaf water loss rates was more promising as a screening technique than leaf diffusive resistance or leaf temperature for mulberry genotypes. In addition to being a very simple method, it could be carried out rapidly. The hybrids which gave the highest leaf yield in dry environment were superior in water retention capacity of excised leaves after 7 and 24 hours of excision from the plant.

CONCLUSION

It was concluded that excised leaf water retention capability measurement was the most promising technique out of the three techniques adopted. Therefore, measurement of excised leaf water loss rates after 7 and 24 hours of excision from the plant is a very useful screening technique for drought resistance.

REFERENCES

- ADJEI G.B., KIRKHAM M.B. (1980) Evaluation of winter wheat cultivars for drought resistance. *Euphytica*, 29, 155-160.
- BAYLES B.B., TAYLOR J.W., BARTEL A.T. (1937) Rate of water loss in wheat varieties and resistance to artificial drought. *J. Amer. Soc. Agron.*, 29, 40-52.
- CLARKE J.M., McCAIG T.N. (1982) Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Sci.*, 22, 503-506.
- DEDIO W. (1975) Water relations in wheat leaves as screening tests for drought resistance. *Can. J. Plant Sci.*, 55, 369-378.
- DONALD C.M. (1968) The breeding of crop ideotypes. *Euphytica*, 17, 385-403.
- EHRLER W.L. (1973) Cotton leaf temperatures as related to soil water depletion and meteorological factors. *Agron. J.*, 65, 404-409.
- EHRLER W.L., IDSO S.B., JACKSON R.D., REGINATO R.J. (1978) Wheat canopy temperature relationship to plant water potential. *Agron. J.*, 70, 251-256.
- FISCHER R.A., WOOD J.T. (1979) Drought resistance in spring wheat cultivars. III. Yield association with morpho-physiological traits. *Aust. J. Agric. Res.*, 30, 1001-1020.
- JONES H.G. (1977) Aspects of the water relations of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to induced drought. *J. Agric. Sci.*, 88, 267-282.
- KAUL R. (1969) Relations between water status and yield of some wheat varieties. *Z. Pflanzenern.*, 62, 145-254.
- PONOMEREV A.A., PANCHENKO N.P. (1960) Water regime of the winter wheat varieties in south Transvolga. *Biol. Abstr.*, 35, 48710.
- SALIM M.H., TODD G.W., STUTTE C.A. (1969) Evaluation of techniques for measuring drought avoidance in cereal seedlings. *Agron. J.*, 61, 182-185.
- SANDHU A.S., LAUDE H.H. (1958) Tests of drought and heat hardiness of winter wheat. *Agron. J.*, 50, 78-81.
- SANDHU B.S., HORTON M.L. (1978) Temperature response of oats to water stress in the field. *Agric. Meteor.*, 19, 329-336.
- SHIMSHI D., EPHRAT J. (1975) Stomatal behaviour of wheat cultivars in relation to their transpiration photosynthesis and yield. *Agron. J.*, 67, 326-331.

EVALUATION DE TECHNIQUES POUR SELECTIONNER LA RESISTANCE A LA SECHERESSE CHEZ LE MURIER

B.N. SUSHEELAMMA, J.S. KUMAR, T. MOGILI, K. SENGUPTA, M.N. PADMA
& N. SURYANARAYANA

Mulberry Breeding and Genetics Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute,
Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, Inde.

Trois techniques de sélection de la résistance à la sécheresse, à savoir la résistance à la diffusion de la feuille, la température des feuilles et la vitesse de séchement des feuilles coupées, ont été évaluées chez 36 hybrides F₁ en régime pluvial (stress) et en terrain irrigué (sans stress). Les rendements en feuilles en milieu irrigué et en régime pluvial ont été utilisés pour caractériser la résistance à la sécheresse chez les hybrides F₁. Ni les mesures de résistance à la diffusion ni la mesure de température ne sont des techniques de sélection adaptées puisqu'aucune différence entre les cultivars n'a été détectée. On observe des différences marquées de la résistance à la diffusion, de la température des feuilles et du taux de perte en eau des feuilles entre les milieux non irrigué et irrigué. Une différence entre les hybrides a été détectée uniquement pour la perte en eau des feuilles coupées. Parmi les différents hybrides F₁ évalués pour la capacité de rétention de l'eau 24 heures après la coupe, S-20 et S-23 ont la meilleure rétention d'eau et s'avèrent également être des hybrides à haut rendement en régime pluvial. La mesure de la capacité de rétention d'eau des feuilles coupées est la plus prometteuse des trois techniques évaluées.

INTRODUCTION

Un grand nombre de techniques ont été utilisées pour mettre en évidence l'intensité du stress de manque d'eau chez les feuilles de blé. Celles-ci comprennent les techniques gravimétriques pour mesurer le contenu en eau des feuilles ou le déficit de saturation (Dedio, 1975), la résistance à la diffusion (Jones, 1977), le potentiel d'eau (Kaul, 1969) et la température des feuilles (Ehrler et coll., 1978). Pour être utilisables dans les programmes de sélection visant à améliorer la résistance à la sécheresse, les méthodes d'évaluation du stress du manque d'eau doivent être suffisamment rapides pour sélectionner un nombre relativement grand de lignées et suffisamment exactes pour permettre de détecter les différences génotypiques réelles. Fischer et coll. (1977) ont suggéré que 10 mesures au moins de résistance à la diffusion par génotype avec un poromètre stomatique sont nécessaires pour détecter les différences génotypiques chez le blé en raison d'un écart type élevé. L'évaluation de la vitesse de perte d'humidité des feuilles coupées s'est révélée prometteuse pour la différenciation de la résistance à la sécheresse des cultivars de blé. Bayles et coll. (1937) ont observé une différence entre les cultivars du blé de mars pour ce qui concerne la vitesse à laquelle les plants coupés perdent leur eau. Les plants coupés des cultivars de blé résistants à la sécheresse perdent leur eau plus lentement que les cultivars moins résistants (Sandhu et Laude, 1958). Salim et coll. (1969) ont observé que les cultivars robustes du blé ont une meilleure rétention en eau des feuilles que les cultivars moins robustes.

Adjei et Kirkham (1980) ont observé qu'un cultivar résistant à la sécheresse avait une meilleure résistance stomatique qu'un cultivar sensible à la sécheresse dans le cycle de croissance. Shimshi et Ephrat (1975) ont observé que la résistance des feuilles à la diffusion est en corrélation négative avec le rendement. Un potentiel en eau plus faible des feuilles entraîne une augmentation de la température

des feuilles. De même, il a été démontré que le stress du manque d'eau entraînait une augmentation de la température des feuilles chez le coton (Ehrler, 1973) et l'avoine (Sandhu et Harton, 1978).

Dans tout programme de sélection, il convient de disposer de moyens rapides et simples pour identifier les caractéristiques recherchées. Plusieurs chercheurs ont suggéré qu'il existait une corrélation entre la résistance à la sécheresse et la rétention de l'eau dans les feuilles ou dans d'autres parties des végétaux, lorsque ceux-ci sont exposés à la dessiccation (Sandhu et Laude, 1958; Ponomerev et Panchenko, 1960; Dedio, 1975; Clarke et McCaig, 1982). Les programmes de sélection de mûrier réalisés jusqu'à présent sont basés sur la sélection en fonction du rendement en lui-même plutôt que sur les caractères physiologiques qui gouvernent le rendement (Donald, 1968). L'objectif de cette étude est donc d'évaluer les méthodes ou techniques physiologiques qui peuvent être utilisées par les cultivateurs de mûrier pour sélectionner des cultivars ou des hybrides résistants à la sécheresse.

MATERIELS ET METHODES

Trente-six hybrides F₁ obtenus par sélection en masse ont été cultivés sur le terrain de 1987 à 1989 en régime pluvial et en milieu irrigué. L'expérience a été réalisée selon un tableau carré de 6 × 6 avec quatre réplicats pour chaque hybride. Des silos mesurant 45 cm × 45 cm × 45 cm ont été préparés pour les deux environnements. Les silos sont remplis de fumier, de terreau et de sable dans une proportion de 1:1:1. Des plantules âgées de 6 mois des 36 hybrides ont été plantés au cours du mois de juillet 1987 en milieux irrigué et non irrigué à espacement de 90 cm × 90 cm. Chaque parcelle expérimentale est pourvue de plantes de lisière pour éliminer l'effet de bordure. Deux tailles ont été réalisées, la première en juin 1988 à 30 cm du sol et la deuxième taille au cours de la dernière semaine d'octobre 1988 à 100 cm du sol. Le fumier est appliqué à raison de 20 tonnes/hectare/an et le N:P:K est appliqué à raison de 120:50:50 kg/hectare/an. L'irrigation est effectuée une fois tous les 15 jours dans les parcelles irriguées à raison de 254 m³/ha. Les parcelles non irriguées sont cultivées en régime pluvial (condition de stress).

Cinq récoltes annuelles ont été faites; toutes les données ne sont pas présentées, seule la moyenne du rendement en feuilles au cours de deux étés est fournie. La température des feuilles et leur résistance à la diffusion ont été mesurées à l'aide d'un poromètre à état stationnaire LICOR LI-1600. Les mesures sont enregistrées 60 jours après la quatrième récolte entre 12 et 14 heures pour les quatre répétitions des parcelles irriguées et non irriguées. Pour l'évaluation du contenu en eau des feuilles coupées, 100 feuilles matures ont été récoltées à 9h00 du matin dans un sac en plastique en avril et transférées en laboratoire dans un environnement régulé de 36 °C et 50 % d'humidité relative. Sept heures et 24 heures après la coupe, les poids des feuilles ont été relevés. Les feuilles sont maintenues ensuite dans un four pendant 3 jours à 80 °C pour permettre le séchage et le poids sec des feuilles est enregistré. Le contenu en eau des feuilles 7 heures et 24 heures après la coupe est calculé par gravimétrie.

RESULTATS ET DISCUSSION

Rendement en feuilles :

Le rendement en feuilles des hybrides F₁ diffère selon que le milieu est sec (stress) ou irrigué (sans stress) (Tableau I). Sur les 36 hybrides évalués pour le rendement en feuilles, S-20 et S-23 donnent les meilleurs rendements, alors que S-19 donne un rendement très faible dans les deux environnements. On constate une très bonne adaptation à l'environnement sec chez l'hybride S-20 qui présente un rendement plus élevé que les autres hybrides F₁ au cours de la période de stress (été).

Résistance des feuilles à la diffusion :

La différence entre les résistances des feuilles à la diffusion des différents hybrides F₁ est négligeable par rapport à l'erreur d'échantillonnage et à la différence génotypique (Tableau I). Cette méthode est donc inutilisable dans les programmes de sélection. De plus, il n'y a aucune relation entre le rendement en feuilles et la résistance à la diffusion (Tableau II). Ce résultat est conforme à celui de Fischer et Wood (1979) sur les cultivars de blé de mars, pour lesquels ils ont observé une corrélation négative entre le rendement en feuilles et la résistance à la diffusion. Cependant, il apparaît une

différence significative de la résistance des feuilles à la diffusion entre le milieu irrigué et le milieu non irrigué (Tableau I).

Température des feuilles :

La température des feuilles des 36 hybrides F₁ ne diffère pas de manière significative à aucun moment de l'échantillonnage (Tableau I). Une différence de la température des feuilles est observée entre les environnements irrigué et non irrigué (Tableau II). La température des feuilles est plus élevée en l'absence d'irrigation qu'en milieu irrigué. Ceci est conforme aux résultats d'Ehrler (1973) pour le coton et de Sandhu et Horton (1978) pour l'avoine.

Feuilles coupées :

Sur les 36 hybrides F₁ évalués pour la capacité de rétention de l'eau 7 heures et 24 heures après la coupe, S-20 et S-23 ont la meilleure capacité de rétention (Tableau I). Ils ont donc été nommés hybrides résistants à la sécheresse. L'hybride S-13 a une capacité de rétention de l'eau beaucoup plus faible 7 heures et 24 heures après la coupe et est considéré comme non résistant à la sécheresse. Ceci confirme les résultats de Sandhu et Laude (1958) et de Clarke et McCaig (1982) chez les cultivars de blé, pour lesquels ils ont observé une rétention de l'eau supérieure chez les cultivars résistants à la sécheresse à celle des cultivars non résistants. Le contenu en eau des feuilles 7 et 24 heures après la coupe est plus élevé chez les feuilles issues de l'environnement irrigué que chez celles issues de l'environnement non irrigué uniquement en été (période de stress : tableau I). Cependant, à la saison pluvieuse, le contenu en eau des feuilles 7 et 24 heures après la coupe est plus élevé chez les feuilles du milieu non irrigué que chez les feuilles du milieu irrigué. Ceci est en accord avec les résultats de Salim et coll. (1969) qui ont observé une amélioration de la rétention de l'eau chez les plants habitués à la sécheresse que chez les plants non habitués au stress. Le contenu en eau des feuilles 24 heures après la coupe présente une corrélation positive et significative avec le rendement en feuilles (Tableau II). L'utilisation du taux de perte d'eau selon la méthode de la feuille coupée dans la sélection variétale est plus efficace si l'on utilise des plants habitués à la sécheresse ou soumis au stress.

L'évaluation des taux de perte en eau des feuilles est une technique de sélection plus prometteuse que la résistance à la diffusion ou la température des feuilles pour les génotypes de mûrier. Outre le fait que c'est une méthode très simple, elle peut être réalisée rapidement. Les hybrides qui donnent le rendement en feuilles le plus élevé en milieu sec sont supérieurs du point de vue de la capacité de rétention d'eau des feuilles coupées 7 et 24 heures après la coupe.

CONCLUSION

On en conclut que l'évaluation de la capacité de rétention de l'eau des feuilles est la plus prometteuse des trois techniques adoptées. L'évaluation des taux de pertes d'eau des feuilles coupées 7 et 24 heures après la coupe est donc une méthode de sélection de la résistance à la sécheresse très utile.

STATISTICAL ANALYSIS OF ADAPTABILITY OF DROUGHT RESISTANT MULBERRY GENOTYPES

B.N. SUSHEELAMMA, M.S. JOLLY, K. SENGUPTA, K. GIRIDHAR, S. BAKSH,
T. MOGILI, R.S. MALLIKARJUNA & T. PAVAN KUMAR

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

Nine promising drought resistant mulberry genotypes, isolated basing on the quantitative and qualitative assessment were evaluated for leaf yield with two check cultivars at three locations (Ananthapur, Chamarajanagar and Mysore). Genotypic behaviour in the three locations was different in yielding potentiality. There was also a significant difference in the leaf yield between genotypes which were cultivated under similar conditions. Several genotypes adaptable to each location were selected after performing the possible statistical analysis.

Keywords : Genotype, environment, interactions, mulberry.

INTRODUCTION

Information on the adaptability of mulberry hybrids cultivated under stress conditions is not available. Therefore newly evolved high-yielding drought resistant genotypes which were isolated basing on the leaf yield and qualitative assessment (Susheelamma *et al.*, in press) were subjected to multilocal trial experiments at Ananthapur (Andhra Pradesh), Chamarajanagar and Mysore (Karnataka) to observe the adaptability performance. The methodology adopted to study the genotypes adaptability in different locations was Finlay and Wilkinson's (1963) methodology. Several genotypes adaptable to each location were selected after performing possible statistical analysis of the data for leaf yield obtained in the present experiment.

MATERIALS AND METHODS

The site selected for the experiment at Mysore had a red loam soil with intermittence of sand and stones and pH was 8.0, whereas Chamarajanagar site had a red loam soil with intermittence of sand and pH was 8.5 and Ananthapur site had a red loam soil with intermittence of stones and pH was 7.5. The annual rainfall during 1986 and 1987 at Mysore, Chamarajanagar and Ananthapur was 625.15 and 392.25 mm, 839.30 and 305.00 mm and 340.00 and 220.40 mm, respectively (the rainfall of 1987 was taken from January to September only). The days temperature at Mysore from January to May during 1986 was between 25.03 and 38.70 °C with a humidity of 70.37 to 60.22 % (the average of temperature and humidity was taken over a period of one month). At Chamarajanagar, the days temperature during the same period was between 23.5 and 38.7 °C with a humidity of 55 to 47 %, while at Ananthapur the days temperature was between 24.00 and 40.00 °C with a humidity of 53.20 to 43.00 %. The soil moisture content at 90 cm soil depth during January to May 1986 was between 13.30 and 8.90 % at Mysore, between 14.40 and 9.85 % at Chamarajanagar and between 5.97 and 1.00 % at Ananthapur. The average evapotranspiration rate in April 1987 was 6 mm per day at Mysore and 7 mm per day at Chamarajanagar and Ananthapur.

The experiment was laid out in a randomised block design and the same replications were maintained at Mysore, Chamarajanagar and Ananthapur. The land was ploughed with a tractor at the same time in Ananthapur, Chamarajanagar and Mysore and deweeded. Pits measuring $45 \times 45 \times 45$ cm were prepared and filled with farmyard manure, sand and soil in a ratio of 1:1:1, respectively. Benzene hexachloride (BHC) powder (5 %) was applied in the pits before planting to avoid white ants. Three-month-old saplings of 9 genotypes and 2 check cultivars were planted in the pits during June 1985. In each replication 95 plants were maintained. Precautions were taken to preserve soil moisture by (a) giving deep digging to the experimental plot before the onset of the monsoon to facilitate water percolation, (b) forming the raised bunds on the four sides of the plots, thereby avoiding runoff of rain water and (c) loosening the soil after each leaf harvest for good aeration. After eight months of planting, the first leaf harvest was taken. Top clipping was done after the second, third and fourth leaf harvests to increase the formation of secondary branches. Five leaf harvests were taken from each location and the respective data were collected. The first harvest was taken during June (before the onset of the monsoon), the second during August (rainy season), the third during November, the fourth during February and the fifth during April (summer season). The first, fourth and fifth harvests were almost at the end, beginning and mid of summer respectively. This enabled to study the variation of leaf yield due to drought conditions existing during summer months. The data were statistically analysed according to the method suggested by Freeman and Perkins (1971). The data were further analysed by linear regression according to the method suggested by Finlay and Wilkinson (1963) to identify genotypes which were suitable to the agroclimatic conditions of Ananthapur, Chamarajanagar and Mysore. Regression lines were drawn by plotting logarithm of individual variety yields against logarithm of site mean yields (the mean yield of all the eleven varieties, at each site and each harvest to find out the regression coefficients. As the number of regression lines would be more (eleven lines in each of the three graphs), only the lines of better performing varieties at the site are shown (Fig. 1, 2 and 3). However, regression coefficients for all the varieties at each site were found out with the help of regression lines only. Again graphs were drawn taking regression coefficients against variety mean yield at each site to identify the genotypic adaptability to 3 locations (Fig. 4 to 6). Statistical analysis and graphics were done using an electronic computer.

RESULTS

The leaf yield data of five harvests of 1986-87 are presented in Tables I, II and III. The analysed data of genotype $\times$ environment interaction are presented in Table IV. The regression coefficients and variety mean yield are given in Table V.

The data of leaf yield of 5 harvests at Ananthapur (Table I) indicated that DRS₂₉, DRS₁₃, DTS₁₄, DRS₂₅ and DRS₆₁ yielded better than other genotypes and check cultivars in all the harvests. Similarly, the data of leaf yield of Chamarajanagar and Mysore (Tables II and III) indicated that DRS₃₄ and DTS₁₄ and DRS₃, DRS₁₃, DRS₃₄ and DTS₁₄ performed better than the other genotypes at Chamarajanagar and Mysore, respectively. However, these data were further analysed to test the genotype $\times$ environment interaction (Table IV). Since the genotype $\times$ environment interaction was significant, further analysis of data was done by the linear regression method of Finlay and Wilkinson (1963) to identify the genotypes according to response types of environment. Fig. 1-6 indicate the regression lines and method adopted to find out the adaptability of genotypes to locations.

DISCUSSION

Genotypic behaviour in three locations, viz. Ananthapur, Chamarajanagar and Mysore, was different in yielding capacity (Tables I, II and III). The pooled analysis of variance to partition the total variation observed in the yield data into components (genotypes, sites and genotype $\times$ environment) for the total yields revealed that genotype $\times$ environment interaction was significant. Therefore, it was evident that the varieties were sensitive to environmental changes and had no common adaptability to all the three sites. Therefore, the regression technique was adapted to identify

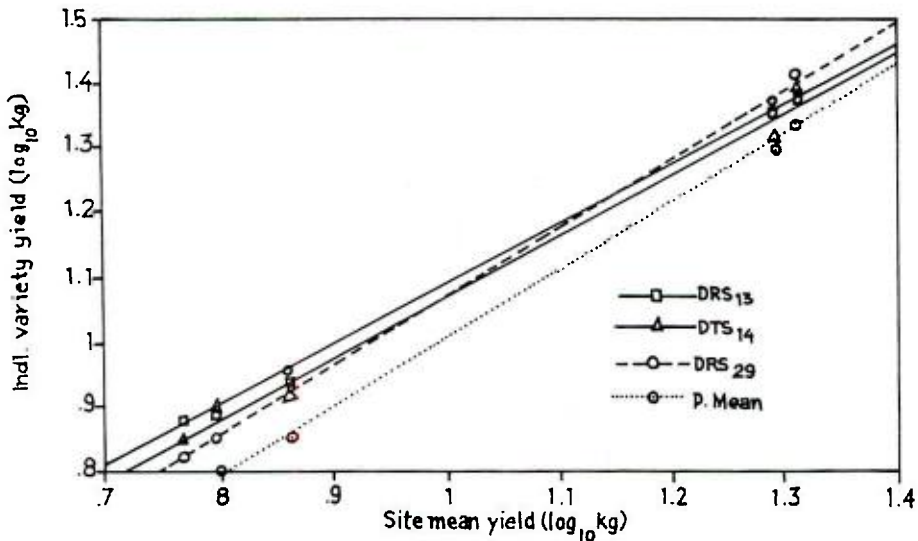


Fig. 1 : Regression lines showing the relation of individual yields of 3 varieties and population mean of 11 varieties of mulberry grown at different environments of Ananthapur.

Fig. 1 : Droites de régression montrant la relation entre les rendements individuels de 3 variétés et la population moyenne de 11 variétés de mûriers cultivées dans différents environnements à Ananthapur.

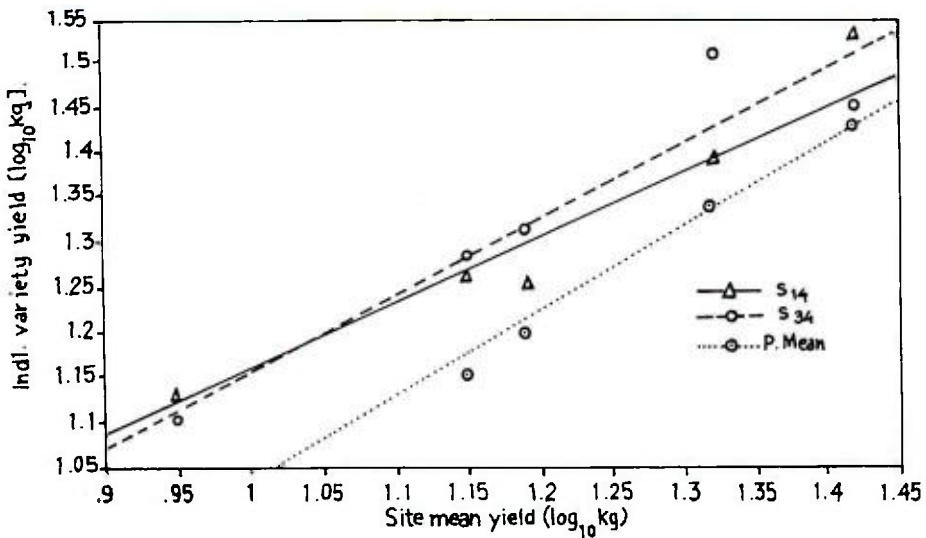


Fig. 2 : Regression lines showing the relation of individual yields of 3 varieties and population mean of 11 varieties of mulberry grown at different environments of Chamarajanagar.

Fig. 2 : Droites de régression montrant la relation entre les rendements individuels de 3 variétés et la population moyenne de 11 variétés de mûriers cultivées dans différents environnements à Chamarajanagar

genotypes according to the response to environment was used. This technique has been effective in emphasising the actual trend of varietal yield responses to a range of natural environments (taking each harvest as an environment, since each harvest was taken at different seasons).

Table I. Mean leaf yield of drought resistant genotypes of mulberry and check cultivars (Local and Kanva-2) cultivated under stress conditions at Ananthapur during the year 1986-87.

Tableau I. Rendement moyen en feuilles de génotypes et de cultivars (Local et Kanva-2) de mûriers cultivés dans des conditions de stress à Ananthapur de 1986 à 1987.

Name of the mulberry genotypes	First leaf harvest (kg) (June)	Second leaf harvest (kg) (August)	Thlrd harvest (kg) (November)	Fourth leaf harvest (kg) (February)	Fifth leaf harvest (kg) (April)	Total of five harvests (kg)	Leaf yield/ha/year (t)
Nom du génotype de mûrier	Première récolte (kg) (Juin)	Deuxième récolte (kg) (Août)	Troisième récolte (kg) (Novembre)	Quatrième récolte (kg) (Février)	Cinquième récolte (kg) (Avril)	Total des récoltes (kg)	Rendement en feuilles /ha/an (t)
DRS ₃	8.43	20.43	19.53	6.31	7.43	62.13	15.67
DRS ₁₀	8.49	20.70	20.25	9.54	8.92	67.90	17.12
DRS ₁₃	8.55	23.05	22.83	7.44	7.64	69.52	17.53
DRS ₁₈	4.85	17.10	19.33	4.21	4.66	50.15	12.69
DRS ₂₅	8.38	24.73	20.43	6.44	6.47	66.45	16.76
DRS ₂₉	8.68	25.90	23.70	6.68	7.14	72.10	18.18
DRS ₃₄	6.24	18.33	18.69	4.14	4.63	52.03	13.12
DRS ₆₁	8.28	22.83	22.62	6.22	7.03	66.98	17.00
DTS ₁₄	8.25	24.31	20.15	7.16	7.91	67.78	17.09
Local	4.85	14.33	13.81	3.19	3.78	39.96	10.08
Kanva-2	4.56	14.33	13.21	3.39	4.38	39.87	10.06
SMY	7.23	20.54	19.50	5.88	6.36	-	-
SE $\pm$	0.084	0.093	0.079	0.061	0.051	-	-
LSD at 5 %	0.244	0.270	0.229	0.176	0.146	-	-

SMY : Site mean yield / Rendement moyen du site.

SE : Standard error / Ecart type.

The population mean and regression lines for yield of eleven varieties were drawn to illustrate the different varietal responses to environments. Because the individual variety yields (log of individual yields) were plotted against the mean yield of all the varieties (log site mean yield), the population mean had a regression coefficient of 1.0. Varieties characterised by regression coefficients of the order of 1.0 with higher yield than the average yield of all the varieties in each harvest have the average adaptability to all the environments (Finlay and Wilkinson, 1963).

At Ananthapur, genotypes DRS₂₉, DRS₁₃, DTS₁₄, DRS₆₁ and DRS₂₅ had regression coefficients of 1.066, 0.948, 0.925, 1.029 and 1.033, respectively, which were of the order of 1.0. In addition,

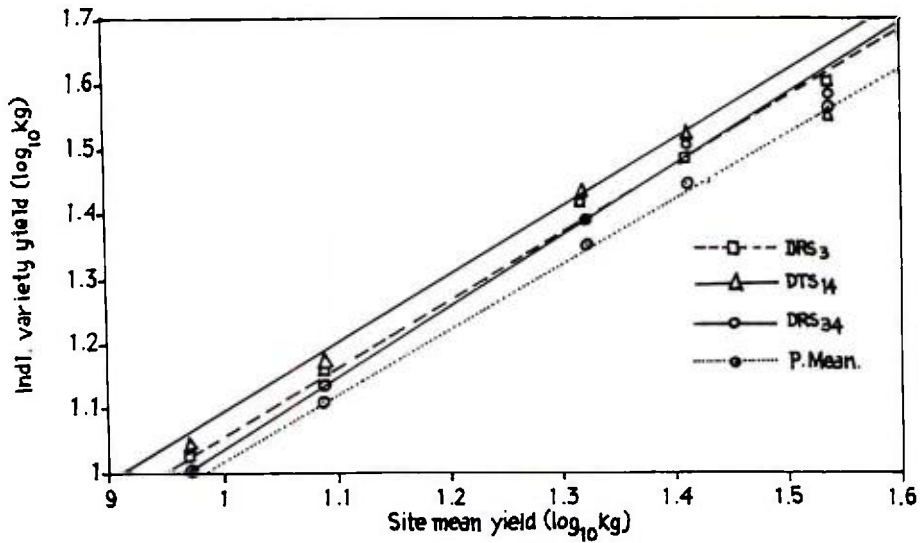


Fig. 3 : Regression lines showing the relation of individual yields of 3 varieties and population mean of 11 varieties of mulberry grown at different environments of Mysore.

Fig. 3 : Droites de régression montrant la relation entre les rendements individuels de 3 variétés et la population moyenne de 11 variétés de mûriers cultivées dans différents environnements à Mysore.

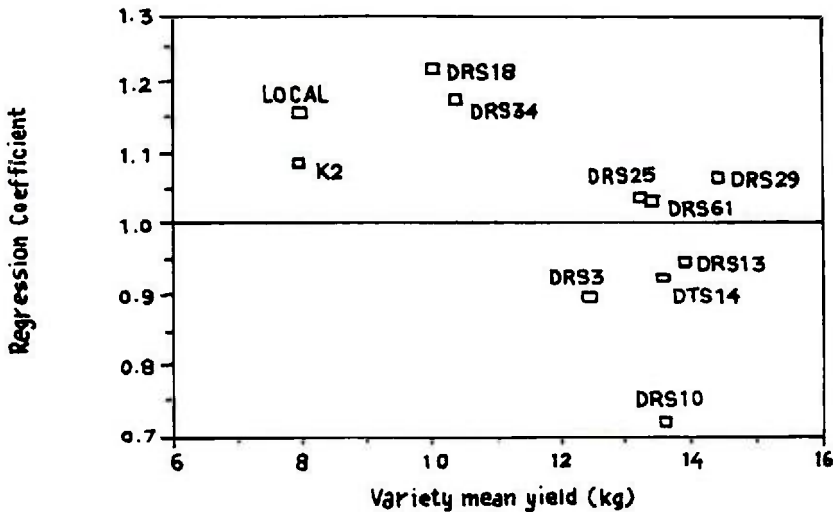


Fig. 4 : The relationship of variety adaptation (regression coefficient) and variety mean yield for eleven varieties at Ananthapur.

Fig. 4 : Relation entre l'adaptation variétale (coefficient de régression) et le rendement moyen par variété pour 11 variétés à Ananthapur.

yields in these genotypes were more than the average yield of all the varieties in all the environments (harvests). Therefore, the genotypes DRS₂₉, DRS₁₃, DTS₁₄, DRS₆₁ and DRS₂₅ had general adaptability to the environments of Ananthapur. This was confirmed by the indications in Fig. 4. However, Kanva-2 and DRS₃ also had regression coefficients of the order of 1.0. But they did not give higher yield than the average yield in some of the harvests. Therefore, they were not considered as adaptable genotypes.

Table II. Mean leaf yield of drought resistant genotypes of mulberry and check cultivars (Local and Kanva-2) cultivated under stress conditions at Chamarajanagar during the year 1986-87.

Tableau II. Rendement moyen en feuilles de génotypes et de cultivars (Local et Kanva-2) de mûriers cultivés dans des conditions de stress à Chamarajanagar de 1986 à 1987.

Name of the mulberry genotypes	First leaf harvest (kg) (June)	Second leaf harvest (kg) (August)	Third leaf harvest (kg) (November)	Fourth leaf harvest (kg) (February)	Fifth leaf harvest (kg) (April)	Total of five harvests (kg)	Leaf yield/ha/year (t)
<i>Nom du génotype de mûrier</i>	<i>Première récolte (kg) (Juin)</i>	<i>Deuxième récolte (kg) (Août)</i>	<i>Troisième récolte (kg) (Novembre)</i>	<i>Quatrième récolte (kg) (Février)</i>	<i>Cinquième récolte (kg) (Avril)</i>	<i>Total des récoltes (kg)</i>	<i>Rendement en feuilles /ha/an (t)</i>
DRS ₃	12.63	20.63	20.36	13.70	6.95	74.27	16.37
DRS ₁₀	15.68	25.43	22.40	16.58	9.70	89.79	19.80
DRS ₁₃	13.70	26.34	22.44	16.46	8.63	87.67	19.33
DRS ₁₈	17.88	27.54	20.30	12.72	13.84	78.44	17.29
DRS ₂₅	12.79	25.28	18.51	18.88	7.44	82.90	18.28
DRS ₂₉	11.51	32.79	22.49	17.21	6.50	90.50	20.00
DRS ₃₄	18.86	28.39	32.39	20.43	12.68	112.75	25.00
DRS ₆₁	13.68	35.43	21.38	18.46	7.88	96.83	21.35
DTS ₁₄	18.58	34.36	23.56	17.65	13.16	107.29	23.65
Local	8.64	12.80	9.76	8.01	4.99	44.20	9.74
Kanva-2	10.75	22.05	16.34	10.18	6.00	65.32	14.40
SMY	14.06	26.45	20.90	15.48	8.87	-	-
SE $\pm$	0.057	0.130	0.120	0.107	0.063	-	-
LSD at 5 %	0.165	0.374	0.293	0.308	0.181	-	-

SMY : Site mean yield / *Rendement moyen du site.*

SE : Standard error / *Ecart type.*

At Chamarajanagar, the genotypes DRS₃₄ and DTS₁₄ had regression coefficients of 0.852 and 0.854, respectively. Regression coefficients were even though less than 1.0, the deviations in the values were not much. The yield of genotypes was higher than the average yield of all the genotypes in each harvest. Therefore, it was confirmed that the genotypes DRS₃₄ and DTS₁₄ had the average adaptability to the environments of Chamarajanagar. This finding was in confirmation with the data

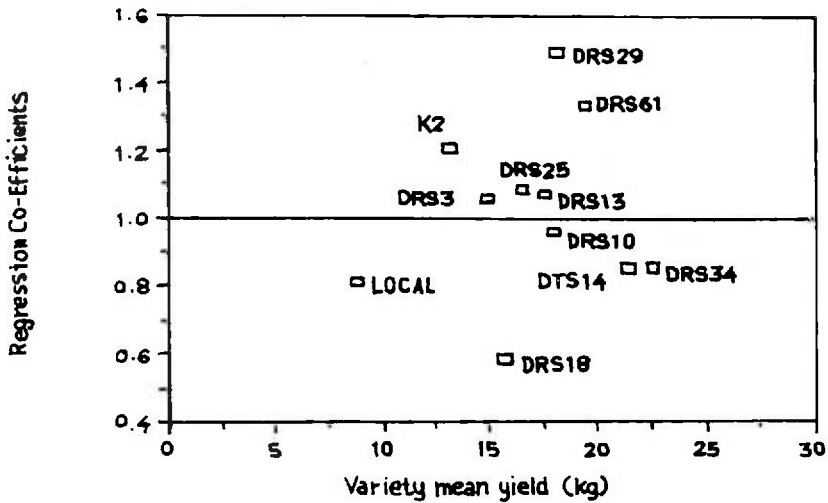


Fig. 5 : The relationship of variety adaptation (regression coefficient) and variety mean yield for eleven varieties at Chamarajanagar.

Fig. 5 : Relation entre l'adaptation variétale (coefficient de régression) et le rendement moyen par variété pour 11 variétés à Chamarajanagar.

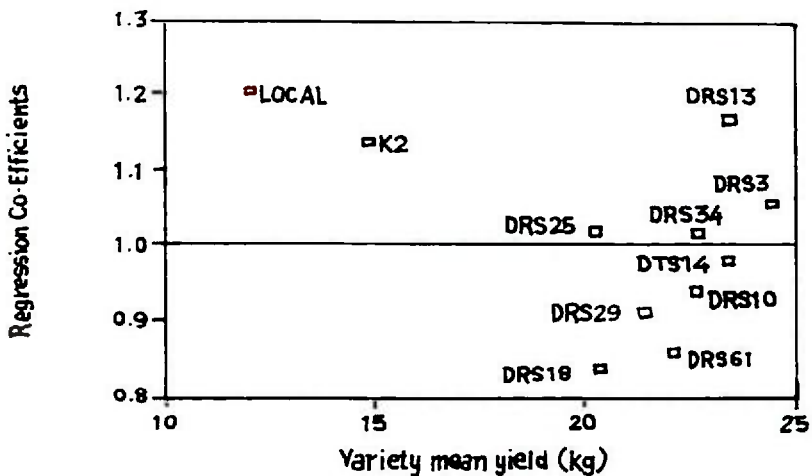


Fig. 6 : The relationship of variety adaptation (regression coefficient) and variety mean yield for eleven varieties at Mysore.

Fig. 6 : Relation entre l'adaptation variétale (coefficient de régression) et le rendement moyen par variété pour 11 variétés à Mysore.

obtained from the graphical representation in Fig. 5. Even though the varieties, DRS₁₀, DRS₂₅ and Local, had regression coefficients of the order of 1.0, their yields were below the average yield of all the varieties in some of the harvests.

Table III. Mean leaf yield of drought resistant genotypes of mulberry and check cultivars (Local and Kanva-2) cultivated under stress conditions at Mysore during the year 1986-87.

Tableau III. Rendement moyen en feuilles de génotypes et de cultivars (Local et Kanva-2) de mûriers cultivés dans des conditions de stress à Mysore de 1986 à 1987.

Name of the mulberry genotypes	First leaf harvest (kg) (June)	Second leaf harvest (kg) (August)	Third leaf harvest (kg) (November)	Fourth leaf harvest (kg) (February)	Fifth leaf harvest (kg) (April)	Total of five harvests (kg)	Leaf yield/ha/year (t)
Nom du génotype de mûrier	Première récolte (kg) (Juin)	Deuxième récolte (kg) (Août)	Troisième récolte (kg) (Novembre)	Quatrième récolte (kg) (Février)	Cinquième récolte (kg) (Avril)	Total des récoltes (kg)	Rendement en feuilles /ha/an (t)
DRS ₃	10.49	40.04	31.53	26.69	13.44	122.23	26.94
DRS ₁₀	10.33	40.22	31.40	18.60	12.64	113.19	25.00
DRS ₁₃	8.29	40.24	28.18	27.16	13.34	117.18	25.83
DRS ₁₈	11.35	35.48	23.50	18.31	13.18	101.82	22.45
DRS ₂₅	8.15	31.29	28.26	20.46	13.11	101.27	22.33
DRS ₂₉	9.63	36.03	23.40	22.33	15.38	106.77	23.54
DRS ₃₄	9.75	36.35	29.19	24.73	13.44	113.46	25.00
DRS ₆₁	12.18	36.45	27.40	21.28	13.15	110.46	24.35
DTS ₁₄	10.63	35.31	30.83	26.69	13.48	116.94	25.78
Local	4.76	25.54	12.44	11.31	5.99	60.04	13.23
Kanva-2	6.65	28.69	18.15	13.52	7.39	74.40	116.04
SMY	9.28	35.05	25.84	21.00	12.23	-	-
SE ±	0.075	0.063	0.189	0.050	0.067	-	-
LSD at 5 %	0.219	0.183	0.546	0.146	0.194	-	-

SMY : Site mean yield / Rendement moyen du site.

SE : Standard error / Ecart type.

At Mysore, the genotypes, DRS₃, DTS₁₄ and DRS₃₄, had regression coefficients of 1.055, 1.016 and 0.979, respectively, which were of the order of 1.0. These varieties gave higher yields than the average yield of all the varieties in the respective harvests. Hence, they were considered as adaptable genotypes to the environments of Mysore. The graphical representation of the data in Fig. 6 confirmed this finding. However, the varieties DRS₁₀, DRS₁₃, DRS₂₉ and DRS₆₁ also had regression coefficients of the order of 1.0 (Table V). But variety yields were below the average yield of all the varieties in some of the harvests.

By observing the varietal adaptation to environments of the 3 locations, DTS₁₄ was found to be fairly adaptable to all the environments of Ananthapur, Chamarajanagar and Mysore.

Table IV. Pooled analysis of variance to partition the total variation of the yields of eleven mulberry varieties in three sites into components (1).

Tableau IV. Analyse de variance pour partager en composants de la variation totale des rendements en feuilles de onze variétés de mûriers provenant de trois sites (1).

Source of variation <i>Source de variation</i>	DF <i>DL</i>	MS <i>CM</i>
Genotypes (G) / <i>Génotypes</i>	10	57.75**
Environments (E) / <i>Environnements</i>	2	425.08**
Gen × Env (G × E)	20	1827.78**
Combined regression / <i>Régression combinée</i>	1	239.28
Residual / <i>Résidu</i>	1	610.88
Interaction (G × E) :		
Heterogeneity of regression / <i>Hétérogénéité de la régression</i>	10	65.84
Residual / <i>Résidu</i>	10	3589.73
Error between replicates / <i>Ecart entre les réplicats</i>	33	2943.34

** P < 0.01

* P < 0.05

(1) : Partitioning of analysis of variance to take into account the regression effects / *Partition de l'analyse de variance afin de mettre en évidence les effets de régression.*

Tableau V. Regression coefficients by linear regression of individual variety yield on site mean yield* for three locations, viz. Ananthapur, Chamarajanagar and Mysore.

Tableau V. Coefficients de régression linéaire obtenus entre les rendements individuels des variétés et le rendement moyen des sites* sur trois plantations : Ananthapur, Chamarajanagar et Mysore.

Variety <i>Variété</i>	Ananthapur		Chamarajanagar		Mysore	
	Regression coefficient <i>Coefficient de régression</i>	Variety mean yield (kg) <i>Rendement moyen par variété (kg)</i>	Regression coefficient <i>Coefficient de régression</i>	Variety mean yield (kg) <i>Rendement moyen par variété (kg)</i>	Regression coefficient <i>Coefficient de régression</i>	Variety mean yield (kg) <i>Rendement moyen par variété (kg)</i>
DRS ₃	0.897	12.42	1.055	14.85	1.055	22.44
DRS ₁₀	0.720	13.58	0.964	17.95	0.938	22.63
DRS ₁₃	0.948	13.90	1.073	17.53	1.165	23.43
DRS ₁₈	1.219	10.03	0.585	15.68	0.838	20.36
DRS ₂₅	1.033	13.29	1.085	16.58	1.018	20.25
DRS ₂₉	1.066	14.42	1.493	18.10	0.912	21.35
DRS ₃₄	1.176	10.40	0.852	22.55	1.016	22.69
DRS ₆₁	1.029	13.39	1.330	19.36	0.864	22.09
DTS ₁₄	0.925	13.55	0.854	21.45	0.979	23.38
Local	1.156	7.99	0.814	8.84	1.203	12.06
Kanva-2	1.085	7.97	1.205	13.06	1.135	14.86

* Mean yield of eleven varieties at each site for each harvest / *Rendement moyen de onze variétés sur chaque site pour chaque récolte.*

REFERENCES

- FINLAY K.W., WILKINSON G.N. (1963) The analysis of adaptation in a plant breeding programme. *Aust. J. Agric. Res.*, 14, 742-754.
- FREEMAN G.H., PERKINS J.M. (1971) Environmental and genotype environmental components of variability. VII. Relations between genotypes grown in different environments and measure of these environments. *Heredity*, 27, 15-23.
- SUSHEELAMMA B.N., JOLLY M.S., SENGUPTA K., VENKATESWARALY M., SURYANARAYANA N. (in press) Qualitative assessment of drought resistant mulberry genotypes cultivated under natural stress (low rainfall conditions) by feeding larvae of *Bombyx mori*. *Proc. Intern. Cong. Trop. Seric. Practices held during 1988*.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ADAPTABILITE DE CERTAINS GENOTYPES DE MURIER RESISTANTS A LA SECHERESSE

B.N. SUSHEELAMMA, M.S. JOLLY, K. SENGUPTA, K. GIRIDHAR, S. BAKSH, T. MOGILI, R.S. MALLIKARJUNA & T. PAVAN KUMAR

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

On a évalué le rendement en feuilles de neuf génotypes prometteurs de mûrier résistants à la sécheresse, isolés sur la base de leurs caractères quantitatifs et qualitatifs, par rapport à deux cultivars témoins sur trois sites de culture (Anantapur, Chamarajanagar et Mysore). Les comportements génotypiques sur les trois sites diffèrent du point de vue du potentiel de rendement. On observe également une différence significative du rendement en feuilles entre des génotypes cultivés dans des conditions identiques. Plusieurs génotypes, adaptables à tous les sites, ont été sélectionnés après analyse statistique.

INTRODUCTION

On ne dispose d'aucune information concernant l'adaptabilité des hybrides de mûrier cultivés dans des conditions de stress. Des génotypes, récemment isolés sur la base du rendement en feuilles et de critères qualitatifs (Susheelamma et coll., sous presse), résistants à la sécheresse et performants ont donc été soumis à des expériences sur plusieurs sites à Ananthapur (Andhra Pradesh), Chamarajanagar et Mysore (Karnataka) afin d'observer leur adaptabilité. La méthodologie adoptée pour étudier l'adaptabilité aux différents sites est celle de Finlay et Wilkinson (1963). Plusieurs génotypes, adaptables à tous les sites, ont été sélectionnés après analyse statistique des données obtenues dans cette étude pour le rendement en feuilles.

MATERIELS ET METHODES

Le site choisi pour l'expérience à Mysore a un sol argileux avec intermittence de sable et de pierres et un pH de 8,0 ; alors que le site de Chamarajanagar a un sol argileux avec intermittence de sable et un pH de 8,5 et le site d'Ananthapur a un sol argileux avec intermittence de pierres et un pH de 7,5. La pluviométrie annuelle en 1986 et 1987 était respectivement de 625,15 et 392,25 mm pour Mysore, 839,30 et 305,00 mm pour Chamarajanagar et 340,00 et 220,40 mm pour Ananthapur (la pluviométrie pour 1987 a été relevée de janvier à septembre uniquement). La température journalière à Mysore de janvier à mai en 1986 se situait entre 25,03 et 38,70 °C avec une humidité relative de 70,37 à 60,22 % (la moyenne des températures et de l'humidité a été calculée sur une période d'un mois). A Chamarajanagar, la température journalière au cours de la même période se situait entre 23,5 et 38,7 °C avec une humidité relative de 55 à 47 % ; pour Ananthapur, la température se situait entre 24,00 et 40,00 °C avec une humidité de 53,20 à 43,00 %. Le contenu du sol en humidité à 90 cm de profondeur de janvier à mai 1986 se situait entre 13,30 et 8,90 % à Mysore, entre 14,40 et 9,85 % à Chamarajanagar et entre 5,97 et 1,00 % à Ananthapur. Le taux moyen d'évapotranspiration en avril 1987 était de 6 mm par jour à Mysore et 7 mm par jour à Chamarajanagar et Ananthapur.

L'expérience a été réalisée selon la méthode des blocs aléatoires et les mêmes réplicats ont été mis en place à Mysore, Chamarajanagar et Ananthapur. La terre a été labourée avec un tracteur au même moment à Ananthapur, Chamarajanagar et Mysore et désherbée. Des cavités de $45 \times 45 \times 45$ cm ont été préparées et remplies de fumier, de sable et de terreau dans des proportions de 1:1:1. De la poudre d'hexachlorure de benzène (BHC) (5 %) a été répandue dans les cavités avant la plantation pour éliminer les fourmis blanches. Des plantules âgés de 3 mois de chacun des 9 génotypes et des deux cultivars témoins ont été plantés dans ces cavités en juin 1985, chaque réplicat contenant 95 plants. Des précautions ont été prises afin de préserver l'humidité du sol par a) bêchage en profondeur de la parcelle expérimentale avant le début de la mousson pour faciliter l'infiltration de l'eau, b) mise en place de petites digues sur les quatre côtés des parcelles afin d'éviter l'écoulement de l'eau de pluie et c) ameublissement du sol après chaque récolte de feuilles pour permettre une bonne aération. La première récolte a été effectuée huit mois après la plantation. L'élagage des branches supérieures a été réalisé après la deuxième, la troisième et la quatrième récolte pour augmenter la formation de ramifications secondaires. Les cinq récoltes de feuilles ont été réalisées dans chacun des sites et les données respectives ont été relevées. La première récolte a été effectuée en juin (avant le début de la mousson), la deuxième en août (saison pluvieuse), la troisième en novembre, la quatrième en février et la cinquième en avril (été). Les première, quatrième et cinquième récoltes ont été faites respectivement vers la fin, le début et le milieu de l'été. Ceci a permis d'étudier la variation du rendement en feuilles due aux conditions de sécheresse régnant au cours des mois d'été. Les données ont été analysées statistiquement selon la méthode suggérée par Freeman et Perkins (1971). Elles ont ensuite été analysées par régression linéaire suivant la méthode suggérée par Finlay et Wilkinson (1963) pour identifier les génotypes adaptés aux conditions agroclimatiques d'Ananthapur, Chamarajanagar et Mysore. Les courbes de régression ont été tracées à partir du logarithme des rendements en fonction du logarithme des rendements moyens des sites (rendement moyen des onze variétés) pour chacun des sites et chacune des récoltes afin de déterminer les coefficients de régression. Le nombre de courbes de régression étant élevé (onze droites pour chacun des trois graphiques), on a retenu uniquement les courbes des variétés les plus performantes (Fig. 1, 2 et 3). Cependant, les coefficients de régression pour toutes les variétés sur chacun des sites ont été déterminés à l'aide des droites de régression. Des graphiques ont également été dessinés en traçant la courbe des coefficients de régression en fonction du rendement moyen des variétés sur chaque site pour identifier l'adaptabilité génotypique aux trois sites (Fig. 4 à 6). L'analyse statistique et les graphiques ont été obtenus à l'aide d'un ordinateur.

RESULTATS

Les données concernant le rendement en feuilles pour 1986-87 sont présentées dans les tableaux I, II et III. Les données concernant l'interaction génotype $\times$ environnement sont présentées dans le tableau IV. Les coefficients de régression et le rendement moyen par site sont donnés dans le tableau V.

Les données concernant le rendement en feuilles des cinq récoltes (Tableau I) indiquent que DRS₂₉, DRS₁₃, DTS₂₅ et DRS₆₁ donnent de meilleurs rendements que les autres génotypes et cultivars témoins pour toutes les récoltes. De même, les rendements en feuilles de Chamarajanagar et Mysore (Tableaux II et III) indiquent que DRS₃₄ et DTS₁₄, pour Chamarajanagar, et DRS₃, DRS₁₃, DRS₃₄ et DTS₁₄, pour Mysore, sont plus performants que les autres génotypes. Ces données ont ensuite été analysées afin de tester l'interaction génotype $\times$ environnement (Tableau IV). L'interaction génotype $\times$ environnement étant significative, une analyse complémentaire des données a été faite selon la méthode de la régression linéaire de Finlay et Wilkinson (1963) afin d'identifier les génotypes suivant les réponses types de l'environnement. Les figures 1 à 6 donnent les courbes de régression linéaire et la méthode adoptée pour déterminer l'adaptabilité des génotypes aux sites.

DISCUSSION

Le comportement génotypique sur les trois sites, Ananthapur, Chamarajanagar et Mysore, présente une différence quant au potentiel de rendement (Tableaux I, II et III). L'analyse groupée de la variance effectuée afin de diviser la variation totale observée dans le rendement en composants (génotypes, environnements et génotypes $\times$ environnement) des rendements totaux révèle que l'interaction génotype $\times$ environnement est significative. Il est donc évident que les variétés sont sensibles aux modifications de l'environnement et n'ont aucune adaptabilité commune aux trois sites. La technique de régression a été adaptée afin d'identifier les génotypes d'après la réponse à l'environnement. Cette technique permet de mettre en évidence la tendance réelle des réponses du rendement variétal à divers environnements naturels (chaque récolte constituant un environnement puisque chacune a été faite à différentes saisons).

La moyenne et les courbes de régression concernant le rendement des onze variétés ont été tracées pour illustrer les différentes réponses des variétés aux environnements. Les rendements des variétés (log des rendements individuels) ayant été tracés en fonction du rendement moyen de toutes les variétés (log du rendement moyen par site), la moyenne des populations donne un coefficient de régression de 1,0. Les variétés caractérisées par des coefficients de régression proches de 1,0 ayant un rendement supérieur à la moyenne de toutes les variétés pour chaque récolte ont une adaptabilité moyenne à tous les environnements (Finlay et Wilkinson, 1963).

Sur le site d'Ananthapur, les génotypes DRS₂₉, DRS₁₃, DTS₁₄, DRS₆₁ et DRS₂₅ donnent respectivement un coefficient de régression de 1,066, 0,948, 0,925, 1,029 et 1,033, proche de 1,0. De plus, le rendement chez ces génotypes est supérieur au rendement moyen de toutes les variétés dans tous les environnements (récoltes). Les génotypes DRS₂₉, DRS₁₃, DTS₁₄, DRS₆₁ et DRS₂₅ ont une adaptabilité globale à tous les environnements d'Ananthapur. Ceci est confirmé par les indications de la figure 4. Bien que Kanva-2 et DRS₃ aient également des coefficients de régression proches de 1,0, ils n'ont pas un rendement supérieur au rendement moyen dans certaines des récoltes et ne sont donc pas considérés comme des génotypes adaptables.

A Chamarajanagar, les génotypes DRS₃₄ et DTS₁₄ ont respectivement des coefficients de régression de 0,852 et 0,854. Bien qu'ils soient inférieurs à 1,0, les écarts des valeurs sont faibles. Le rendement des génotypes est supérieur au rendement moyen de tous les génotypes pour chaque récolte. Ceci confirme donc que les génotypes DRS₃₄ et DTS₁₄ ont une adaptabilité moyenne aux environnements de Chamarajanagar. Ce résultat confirme les données obtenues par la représentation graphique de la figure 5. Bien que les génotypes DRS₁₀, DRS₂₅ et Local aient des coefficients de régression proches de 1,0, leur rendement est inférieur au rendement moyen des toutes les variétés dans certaines récoltes.

A Mysore, les génotypes DRS₃, DTS₁₄ et DRS₃₄ ont respectivement des coefficients de régression de 1,055, 1,016 et 0,979, qui sont proches de 1,0. Ces variétés ont des rendements en feuilles supérieurs au rendement moyen de toutes les variétés dans les récoltes respectives. La représentation graphique des données dans la figure 6 confirme ce résultat. Cependant, bien que les variétés DRS₁₀, DRS₁₃, DRS₂₉ et DRS₆₁ aient également un coefficient de régression proche de 1,0 (tableau V), elles ont un rendement inférieur au rendement moyen de toutes les variétés dans certaines des récoltes.

L'observation de l'adaptation des variétés aux environnements des trois sites révèle que DTS₁₄ est assez adaptable à tous les environnements d'Ananthapur, Chamarajanagar et Mysore.

MATERIALS AND METHODS

Mulberry leaves :

The mulberry, *Morus alba*, "shinn-ichinose" in Japanese, was cultivated in the field of our experimental station. Leaves were obtained in the autumn and were lyophilized with Freeze dryer F1 (Fuji Ika Sangyo, Japan).

Sample preparation :

The lyophilized sample (5 mg) was homogenized with a Physcotron (Niti-On, Tokyo, Japan) in a medium (330 μ l) that consisted of 0.4 N HClO₄ supplemented with 50 mM EDTA and 0.1 N sodium metabisulphate. After filtration, 80 μ l of the solution were injected onto the HPLC column.

HPLC with electrochemical detection (ECD) :

The three-dimensional HPLC system (Coulchem Electrode Array System, Neurochem ESA, Bedford, MA) consists of a gradient HPLC system and 16 high-sensitivity coulometric electrochemical detectors coupled with a compatible computer. The concept and inherent advantage of a multi-electrode HPLC system has been described elsewhere (Matson *et al.*, 1984). The operation methods and mobile phase were previously reported by Takeda *et al.* (1991).

Concentration of individual catecholamines was calculated based on the peak response of known amounts of standard compounds. Analysis of the samples was replicated five times.

Chemicals :

The chemicals for analyses were of analytical reagent grade. All compounds were purchased from Sigma (St Louis, MO).

RESULTS

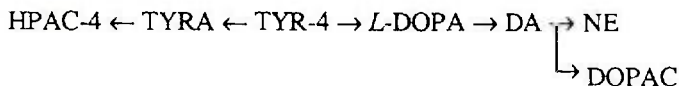
Biogenic amines and their precursors :

A wide range of biogenic amines were detected in the leaves of *Morus alba* ; DA, DOPAC, HPAC-4, L-DOPA, NE, and TYRA were detected (Table I). DA occurred in one order higher amount (ng/g of dry powder) whereas NE had the lowest level.

As amino acids, KYN, TRP, and TYR-4 were detected in the leaves in almost the same level.

Metabolic pathways :

Metabolic pathways such as



for catecholamine were found (Fig. 1). In amino acids, a metabolic pathway such as TRP $\rightarrow$ KYN was detected (Table I).

DISCUSSION

This is the first report on the presence of catecholamines in *Morus* leaves. Previously, the presence of DOPA in *Mucuna* seeds was reported, and L-DOPA of high contents seems to act as an anti-feedant to insects (Rehr *et al.*, 1973). The concentration of DOPA in *Morus* leaves is much lower than in *Mucuna* seeds. Therefore, L-DOPA in *Morus* leaves does not seem to act as an anti-feedant to insects.

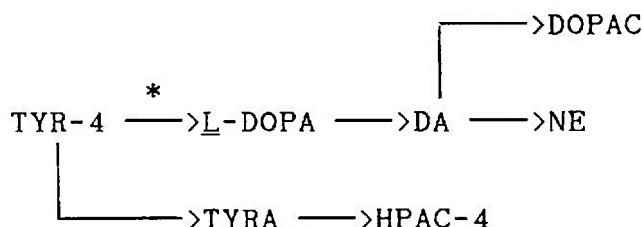
Table I. Levels* of biogenic amines and their precursors in the leaves of *Morus alba*.

Tableau I. Niveaux* des amines biogéniques et de leurs précurseurs dans les feuilles de *Morus alba*.

Compounds	pg/g (dry powder) Mean $\pm$ SD
Composés	pg/g (poudre sèche) Moyenne $\pm$ Ecart type
DA (dopamine)	54.370 $\pm$ 0.44**
DOPAC (dihydroxyphenylacetic acid) <i>DOPAC (acide dihydroxyphényle-acétique)</i>	58.503 $\pm$ 5.08
HPAC-4 (hydroxyphenyleacetic acid) <i>HPAC-4 (acide hydroxyphényle-acétique)</i>	15.719 $\pm$ 0.75
KYN (kynurenine) / <i>KYN (cynurénine)</i>	94.377 $\pm$ 5.76
L-DOPA (dopa)	18.818 $\pm$ 3.79
MN (metanephrine) / <i>MN (métanéphrine)</i>	24.682 $\pm$ 4.94
NE (norepinephrine) / <i>NE (norépinéphrine)</i>	7.842 $\pm$ 0.70
TRP (tryptophan) / <i>TRP (tryptophane)</i>	149.806 $\pm$ 5.12
TYRA (tyramine)	14.625 $\pm$ 0.98
TYR-4 (tyrosine)	111.785 $\pm$ 11.50

* Ratio accuracies for peak purity are over 0.7 (see Takeda *et al.*, 1991) / *L'exactitude des rapports pour la pureté des pics est supérieure à 0,7 (voir Takeda et coll., 1991).*

** ng/g (dry powder) / *ng/g (poudre sèche).*

Fig. 1 : Metabolic pathways of aromatic amino acids in leaves of *Morus alba*.

Abbreviations : see Table I.

* Already well-known metabolic pathways in plants.

Fig. 1 : Voies métaboliques des acides aminés aromatiques chez les feuilles de *Morus alba*.

Abréviations : voir tableau I.

* Voies métaboliques déjà connues chez les végétaux.

There are a few reports on the composition of free amino acids in the leaves of *Morus alba* (Yamashita and Yazawa, 1980 ; Machii, 1990) but no report on TRP and KYN. Machii (1990) measured the levels of gamma-aminobutyric acid (GABA) in mulberry leaves, and he reported on high contents of gamma-GABA and their relation to species. Action of gamma-GABA caused the blood pressure to reduce in rats (Omori *et al.*, 1987). Therefore, gamma-GABA in *Morus* leaf powder might reduce human high-blood pressure.

It was found in plants metabolic pathways of TYR-4 → DOPA → DA → NE which are popular in animals, but metabolic pathways and biological functions of catecholamines in the plants are not known. Caffeic acid is very active for antibacterial activity (Iizuka *et al.*, 1976). There is a possibility that L-DOPA detected is a precursor of caffeic acid as estimated from the general metabolic pathways of aromatic amino acids in mammals.

In the present experiments, detectable biogenic amines and their precursors were found in trace amounts. Therefore, it is reasonable to think that if "Kuwacha-tea from mulberry" is taken in regular amounts, neither pharmacological nor poisonous effects are expected. However, we must pay attention to over uptake of gamma-GABA (from too much "Kuwacha").

REFERENCES

- IIZUKA T., KOIKE S., MIZUTRANI J. (1976) Isolation and identification of caffeic acid and 3-hydroxyanthranilic acid from feces of silkworm larvae reared on the artificial diet. *J. Sericult. Sci. Japan*, 45, 321-327.
- MACHII H. (1990) On gamma-aminobutyric acid contained in mulberry leaves. *J. Sericult. Sci. Japan*, 59, 381-382.
- MATSON W.R., LANGLAIS P., VOLICER L., GAMACHE P.H., BIRD E.D., MARK K.A. (1984) *n*-electrode three-dimensional liquid chromatography with electrochemical detection for determination of neurotransmitters. *Clin. Chem.*, 30, 1477-1488.
- NOMURA T. (1988) Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. *In Progress in the chemistry of organic natural products*, Eds. W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby and Ch. Tamm, Springer-Verlag, New York, 53, 88-201.
- OMORI M., YANO T., OKAMOTO J., TSUSHIDA T., MURAI T., HIGUCHI M. (1987) Effect of anaerobically treated tea (Gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 61, 1449-1451.
- TAKEDA N., TAKAOKA H., SHIMIZU T., YAZAWA M., YAGI S. (1991) Biogenic amine levels in the central nervous system and hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 677-682.
- TSUSHIDA T., MURAI T., OMORI M., OKAMOTO J. (1987) Production of a new type tea containing a high level of gamma-aminobutyric acid. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 61, 817-822.
- YAMASHITA T., YAZAWA M. (1980) Growth of mulberry leaves and changes of free amino acids contents. *J. Sericult. Sci. Japan*, 49, 397-403.

LES ACIDES AMINES AROMATIQUES DANS LES FEUILLES DE *MORUS ALBA* ET LEUR VALEUR MEDICINALE

T. SHIMIZU*, M. YAZAWA* & N. TAKEDA**

* Department of Insect Physiology and Behavior, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japon.

** Department of Biotechnology, COSMO Research Institute, Gongendo Sate, Saitama 340-01, Japon.

Au Japon, la poudre de feuilles de *Morus alba* est utilisée par certaines personnes dans des boissons médicinales mais sa composition chimique n'est pas clairement connue. Des traces d'acides aminés aromatiques décelées dans les feuilles de *Morus alba* ont été analysées avec un chromatographe liquide à haute performance équipé d'un détecteur électrochimique de type coulométrique (HPLC-ECD). Diverses amines biogéniques ont été détectées au seuil du picogramme et on a pu mesurer de la DA (dopamine) en concentrations beaucoup plus importantes (ng/g de poudre sèche). Les 2 voies métaboliques suivantes sont présentes dans les feuilles : l'une est KYN (cynurénine) $\leftarrow$ TRP (tryptophane) et l'autre est HPAC-4 (acide hydroxyphénylacétique) $\leftarrow$ TYRA (tyramine) $\leftarrow$ TYR-4 (tyrosine) $\rightarrow$ L-DOPA (dopa) $\rightarrow$ DA (dopamine) $\rightarrow$ NE (norépinéphrine).
 $\rightarrow$ DOPAC (acide dihydroxyphénylacétique)

Cet article discute de la valeur médicinale du thé de *Morus alba* sur la base de la présence de ces acides aminés.

INTRODUCTION

L'infusion à base de poudre de feuilles et de racines de mûrier est utilisée comme boisson médicinale traditionnelle au Japon (voir : Nomura, 1988) mais sa composition chimique n'est pas bien connue. Tsushida et coll. (1987) et Machii (1990) ont mesuré l'acide gamma-aminobutyrique (AGAB) dans l'infusion et dans les feuilles de mûrier et Tsushida et coll. (1987) ont développé le "thé gabaron" à l'aide d'azote gazeux. Le "thé gabaron" a la propriété de diminuer l'hypertension (Omori et coll., 1987) et cette infusion à base de feuilles de mûrier, "Kuwacha-(R)" en japonais, est actuellement commercialisée par Hoshina Co. Ltd., Saitama, Japon.

Nous étudions ici les acides aminés traces ayant des fonctions biologiques et décrivons les voies métaboliques de certains acides aminés dans les feuilles de *Morus alba* à l'aide de la méthode HPLC-ECD.

MATERIELS ET METHODES

Feuilles de mûrier :

Le mûrier *Morus alba*, "shinn-ichinose" en japonais, a été cultivé dans la mûraie de notre station expérimentale. Les feuilles ont été récoltées en automne, puis lyophilisées dans un dessiccateur à froid F1 (Fuji Ika Sangyo, Japon).

Préparation de l'échantillon :

L'échantillon lyophilisé (5 mg) est broyé à l'aide un Physcotron (Niti-on, Tokyo, Japon) dans un milieu (330 µl) comprenant 0,4 N HClO₄ additionné de 50 mM EDTA et de 0,1 N métabisulfate de sodium. Après filtrage, 80 µl de la solution sont injectés sur une colonne HPLC.

HPLC à détection électrochimique (DEC) :

Le système tridimensionnel HPLC (système de rangées d'électrodes coulochem, Neurochem ESA, Bedford, Massachusetts, USA) est composé d'un système HPLC à gradient et de 16 détecteurs électrochimiques coulométriques à haute sensibilité couplé à un ordinateur. Le concept et l'avantage intrinsèque d'un système HPLC à plusieurs électrode a été décrit par ailleurs (Matson et coll., 1984). Les modes opératoires et la phase mobile ont été décrits par Takeda et coll. (1991).

La concentration des catécholamines a été calculée sur la base des pics-réponses de quantités connues de composés standards. L'analyse des échantillons a été répétée cinq fois.

Produits chimiques :

Les substances chimiques utilisées sont de grade "pour analyse". Tous les composés ont été achetés chez Sigma (St Louis, Missouri, USA).

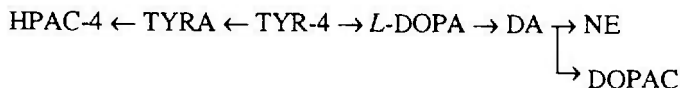
RESULTATS**Les amines biogéniques et leurs précurseurs :**

De nombreuses variétés d'aminés biogéniques ont été détectées dans les feuilles de *Morus alba* : DA, DOPAC HPAC-4, L-DOPA, NE et TYRA (tableau I). La quantité de DA est d'un ordre de grandeur supérieur (ng/g de poudre sèche) tandis que le niveau de NE est minimal.

Les acides aminés KYN, TRP et TYR-4 détectés dans les feuilles sont pratiquement au même niveau.

Voies métaboliques :

Pour la catécholamine (Fig. 1), on observe le chemin métabolique suivant :



Pour les acides aminés, la voie métabolique identifiée est la suivante (tableau I) : TRP → KYN.

DISCUSSION

La présence de catécholamines dans les feuilles de *Morus* est décrite ici pour la première fois. La présence de DOPA dans les graines de *Mucuna* a déjà été observée et il semble que les contenus élevés en L-DOPA agissent comme des inhibiteurs alimentaires chez les insectes (Rehr et coll., 1973). La concentration de DOPA dans les feuilles de *Morus* est beaucoup plus faible que celle contenue dans les graines de *Mucuna*. La L-DOPA contenue dans les feuilles de *Morus* ne semble donc pas servir d'inhibiteur alimentaire.

Il existe quelques études sur les acides aminés libres dans les feuilles de *Morus alba* (Yamashita et Yazawa, 1980 ; Machii, 1990), mais aucune sur le TRP et la KYN. Machii (1980) a mesuré les niveaux d'acide gamma-amynobutyrique (AGAB) dans les feuilles de mûrier ; il a fait état de contenus élevés en AGAB. L'action de l'AGAB entraîne une baisse de la pression artérielle chez le rat (Omori et coll., 1987).

Il se peut donc que l'AGAB contenu dans la poudre de feuille de *Morus* permette de diminuer l'hypertension artérielle humaine.

Chez les végétaux, on a observé les voies métaboliques $TYR-4 \rightarrow DOPA \rightarrow DA \rightarrow NE$, qui sont courantes chez les animaux ; cependant, on ne connaît pas les voies métaboliques et les fonctions biologiques des catécholamines chez les végétaux. L'acide caféique a une forte activité antibactérienne (Iizuka et coll., 1976). Il est possible que la *L-DOPA* détectée soit un précurseur de l'acide caféique comme cela a été suggéré pour les voies métaboliques des acides aminés aromatiques chez les mammifères.

Dans cette étude, des amines biogéniques ainsi que leurs précurseurs ont été détectés en quantités infimes. Il est donc raisonnable de penser que "Kuchawa", le thé à base de mûrier, peut être consommé régulièrement sans occasionner d'effets pharmacologiques ou toxiques. Il ne faut toutefois pas négliger le risque de surconsommation d'AGAB (présent dans le "Kuchawa").

HISTOPATHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES IN MULBERRY (*MORUS ALBA* L.) LEAVES DUE TO INFECTION BY *AECIDIUM MORI* (BARCL.) SYD. ET BUTLER

G.C. VIJAYAKUMAR

Department of Botany, College of BS&H, University of Agricultural Sciences,
Bangalore - 560 065, India.

The leaves of mulberry (Morus alba L.) variety Kanva-2 (M5) infected with Aecidium mori (Barcl.) Syd. et Butler, which causes the mulberry rust disease, were examined histopathologically and histochemically. The fungus was confined primarily to the lower epidermis of the leaf with orange yellow specks which caused severe histomorphological changes in the mesophyll tissue. Infected leaves became hypertrophied and gradually increased in thickness at medium infection followed by a gradual decrease in thickness with the progression of the disease. The polysaccharide content increased at medium infection sites. In heavy infection areas the number of polysaccharide grains was less in palisade cells than in spongy cells. The starch granules accumulated in the areas surrounding the infection centre and gradually disappeared during sporulation. The large-sized proteinoplasts of healthy leaves disintegrated and disappeared completely at heavy infection stage. However, there was a slight decrease of RNA in the diseased leaves as compared to the healthy ones.

Keywords : Histochemistry, histopathology, hypertrophy, leaf rust, *Morus alba* L.

INTRODUCTION

The leaf rust of the mulberry (*Morus alba* L.), a serious disease caused by *Aecidium mori* (Barcl.) Syd. et Butler, is of major economic importance. The affected leaves become swollen and deformed, and feeding of such leaves to silkworms is not nutritive (Sundareswaran *et al.*, 1988). There is no extensive investigation commensurate with its importance in the mulberry which is the sole food of silkworms.

Some histological studies of rust-affected parts have been reported in other plants (Wolf and Wolf, 1952) but all of them are primarily descriptive. The major objective of this study is to know the degree of histopathological and histochemical changes in the mulberry leaf tissues due to the infection of *Aecidium mori* (Barcl.) Syd. et Butler.

MATERIALS AND METHODS

The leaves of the cultivar (Kanva-2 or M5) were collected in spring 1989 from the fields of Gandhi Krishi Vignana Kendra, University of Agricultural Sciences, Bangalore - 560 065, India. The plant material is characterised by large, thick, unlobed leaves and is a recommended variety for its higher yield of better quality leaves as compared to the other varieties.

The healthy and infected leaves were fixed in Carnoy's B (ethyl alcohol 6 parts + chloroform 3 parts + acetic acid one part by volume) for one hour, dehydrated in ethyl alcohol-n' butanol series, embedded in paraffin wax of 58 °C. The serial sections of 10 µm thickness were stained to detect insoluble polysaccharides by periodic Schiff's reagent (PAS) method (Jensen, 1962), to localise

Fig. 1-7 : Cross sections of the leaves of *Morus alba* L. showing histochemical changes due to the infection by *Aecidium mori* (Barcl.) Syd. et Butler (magnification 400 ×).

Fig. 1-7 : Coupes transversales des feuilles de *Morus alba* L. montrant les modifications histochimiques dues à l'infestation par *Aecidium mori* (Barcl.) Syd. et Butler (grossissement 400 ×).

Fig. 1 : Healthy leaf with crowded starch grains both in the palisade and spongy cells.

Fig. 1 : Feuille saine contenant des grains d'amidon agglutinés dans les cellules palissadiques et dans les cellules spongieuses.

Fig. 2 : In heavy infection, the number of polysaccharide grains was less in palisade cells than in spongy cells. The starch granules accumulated in the area surrounding the infection centre.

Fig. 2 : Chez les feuilles fortement infestées, le nombre de grains de polysaccharide est moins important dans les cellules palissadiques que dans les cellules spongieuses. Les granules d'amidon s'accumulent dans la zone entourant le centre de l'infestation.

Fig. 3 : Healthy leaf rich in proteinoplasts.

Fig. 3 : Feuille saine riche en protéinoplastes.

Fig. 4 : In medium infection, hypertrophied cells show disintegration of protein contents.

Fig. 4 : Chez les feuilles moyennement infestées, les cellules hypertrophiées font apparaître une désintégration des contenus protéiques.

Fig. 5 : In heavy infection, the proteinoplasts have disappeared completely.

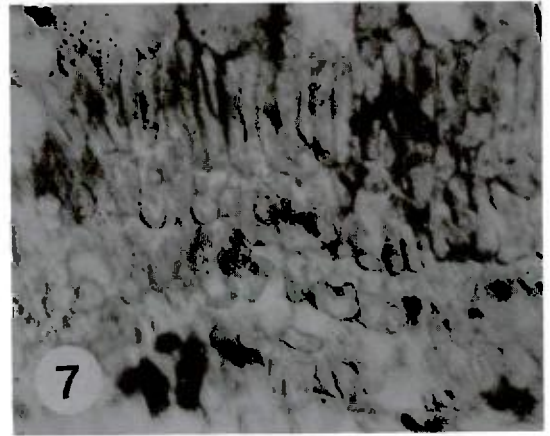
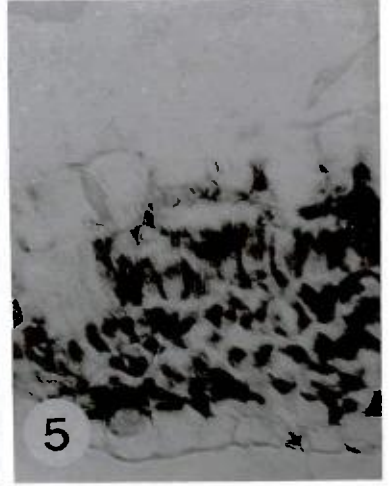
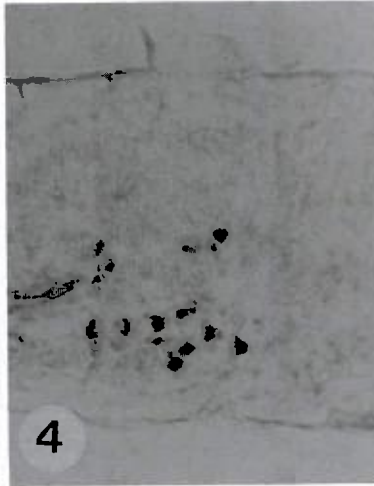
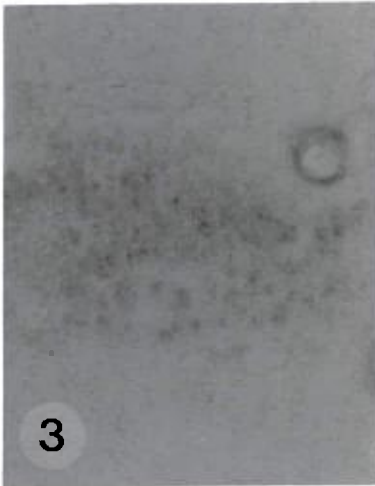
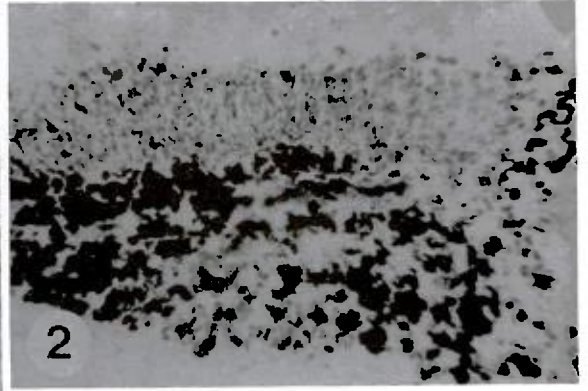
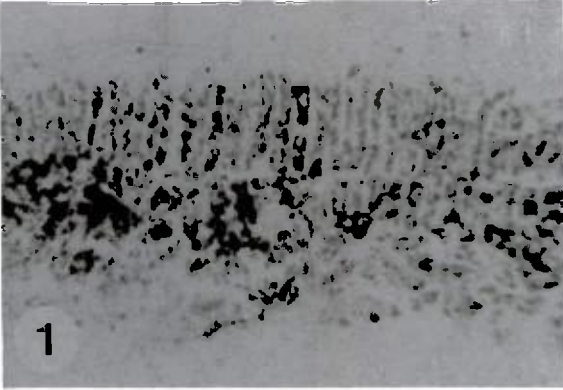
Fig. 5 : Chez les feuilles fortement infestées, les protéinoplastes ont complètement disparu.

Fig. 6 : Healthy leaf with uniformly distributed, rich RNA.

Fig. 6 : Feuille saine riche en ARN uniformément réparti.

Fig. 7 : In heavy infection, mesophyll cells have a reduced RNA content.

Fig. 7 : Chez les feuilles fortement infestées, les cellules mésophylliennes ont un taux d'ARN faible.



proteins by mercuric bromophenol blue (MBB) method (Mazia *et al.*, 1953) and for nucleic acids by toluidine blue method (Feder and O' Brien, 1968).

RESULTS AND DISCUSSION

Histopathology :

The mulberry leaf is dorsiventrally differentiated with a ground tissue consisting of columnar palisade chlorenchyma and spherical spongy chlorenchyma lying between two epidermal layers. The palisade cells contain numerous chloroplasts. The spongy chlorenchyma has large intercellular spaces and fewer chloroplasts. The upper epidermis is multilayered and is thickly cutinized externally. Cystoliths are distributed regularly throughout the inner upper epidermal layer.

The histological changes that occurred in the infected leaves are compared to the histological structures in the healthy ones (Table I). Histology of chlorotic and asymmetric leaves produced on infected plants was variable due to the presence of *Aecidium mori* which appeared within the plant and accelerated the differentiation of leaf tissues (Fig. 4).

Table I. Histological characters of healthy and infected leaves of *Morus alba* L.

Tableau I. Caractères histologiques des feuilles saines et infestées de *Morus alba* L.

Tissues	Variety	Nature of leaves		
		Healthy	Medium infection	Heavy infection
<i>Tissues</i>	<i>Variété</i>	<i>Nature des feuilles</i>		
		<i>Saines</i>	<i>Infestation moyenne</i>	<i>Infestation forte</i>
LT	M ₅	142.8	160.4*	125.2*
TPP	M ₅	43.2	60.0**	42.8 ^{NS}
LPC	M ₅	34.8	40.4**	25.2*
DSC	M ₅	10.4	12.8**	10.8 ^{NS}

(Size in μm / Taille en μm)

LT : Leaf thickness / *Epaisseur de la feuille*.

TPP : Thickness of palisade parenchyma / *Epaisseur des parenchymes palissadiques*.

LCP : Length of the palisade cell / *Longueur de la cellule palissadique*.

DSC : Diameter of the spongy cell / *Diamètre de la cellule spongieuse*.

** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %*.

* Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %*.

NS : Not significant / *Non significatif*.

The infected leaf exhibited hypertrophy of mesophyll tissues leading to the increase in leaf thickness. This was due to the increase in the thickness of palisade parenchyma (the length of palisade

cells) and the diameter of spongy cells (Table I). Such differentiation may be because of the production of indoleacetic acid by the pathogen (Wolf and Wolf, 1952). In heavy infection sites, the cells were totally collapsed, causing the disorganisation and disintegration of the mesophyll. The lower epidermis was broken during the formation of aecidial pockets with diffused metabolites (Fig. 4). The infection was also spread to the vascular bundle resulting in the degradation of vascular tissues.

Histochemistry :

Significant histochemical changes were observed due to infection of the healthy plants (Fig. 2, 4, 5 and 7). The number of polysaccharide grains in palisade and spongy cells of healthy leaves was higher as compared to those in infected ones (Fig. 1). Due to infection, the amount of starch increased at medium infection centre (Fig. 2) and sharply declined at heavy infection areas. The present findings are in conformity with the reports on *Phaseolus vulgaris* (Mirocha and Zakia, 1966) and in the rusted bean (Inmann, 1962). In heavy infection areas the number and size of starch grains got reduced in palisade cells. There was a net movement of metabolites towards the infected zone and they accumulated in the surrounding areas of the infection centres (Fig. 2). This nature of changes probably was elicited in part by the chemicals agents produced by the fungus. The starch accumulation seems to be partly due to the decreased activity of β -amylase in the area surrounding the infection centres (Tanaka and Akai, 1960). The starch granules disappeared gradually around the infection centre during sporulation (Fig. 2). This indicates that synthesized polysaccharides were completely utilized by the pathogen for the cellular metabolism (Suhas *et al.*, 1981).

In healthy leaves, the proteinoplasts in palisade and spongy cells were numerous (Fig. 3). Due to infection lessening in stainability accompanied by the degradation of protein material in the plastids was noticed (Fig. 4).

In severe infection areas there was no indication of protein positive bodies, which may be due to the action of certain toxic metabolites produced by the fungus (Fig. 5). Earlier reports on different plants reveal that the toxin causes drastic changes in synthesizing proteins (Premalata Singh, 1988 ; Vijayakumar, 1991 ; Suhas *et al.*, 1981).

The RNA content was rich in healthy leaves which disappeared completely at heavy infection sites and the nuclei stained faintly for DNA (Fig. 7).

With the complete absence of starch and proteins and with the accumulation of some toxic content in them, the infected leaves are not only less nutritive but also bound to adversely affect the health of the silkworms feeding on them. As a result, the silkworms may get reduced in size and perform poorly. The complete elucidation of the causative agents produced by the fungus deserves more attention in understanding the pathogenicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

I thank Dr Syamasundar Joshi for reviewing the manuscript and helpful suggestions.

REFERENCES

- FEDER N., O'BRIEN T.P. (1968) Plant microtechnique : some principles and new methods. American J. Bot., 55, 123-142.
 INMAN R.E. (1962) Disease development, disease intensity and carbohydrate levels in rusted bean plants. American Phytopathology, 52, 1207-1211.
 JENSEN W.A. (1962) Botanical History. San Francisco.
 MAZIA D., BREWER P.A., ALFERT M. (1953) The cytochemical staining and measurement of proteins with mercuric bromophenol blue.
 MIROCHA C.J., ZAKI A.I. (1966) Fluctuation in amount of starch in host plants invaded by rust and mildew fungi. American Phytopathology, 56, 1220-1224.
 PREMALATHA SINGH (1988) Aflatoxin production and changes in protein and caloric value of some cereals infected by *Aspergillus parasiticus*. J. Indian Bot. Society, 67, 1-2.

- SUHAS P., WANI P.V. RAI, JOSHI SYAMASUNDAR (1981) Histochemical changes in pearl millet plants grown from sg-toxin treated seeds. *Indian Phytopathology*, 34(2), 187-190.
- SUNDARESWARAN P., GOVINDAIHA, SRINIVASAN E.B., JOLLY M.S. (1988) Effect of leaf rust disease on the nutritive composition of mulberry (*Morus alba* L.). *Indian J. Seric.*, 27(2), 159-160.
- TANAKA J., AKAI S. (1960) On the mechanism of starch accumulation in tissues surrounding sports in leaves of rice plants due to the attack of *Cochiliobolus miyabeanus* : II. On the activities of β -amylase and inverterase in tissues surrounding spots. *Phytopathol. Soc. Japan Ann.*, 25, 80-84.
- VIJAYAKUMAR G.C. (1991) Histopathological and histochemical changes in mulberry (*Morus alba* L.) powdery mildew due to infection by *Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst. *Sericologia*, 31(4), 703-707.
- WOLF F.T., WOLF F.A. (1952) Pathology of camellia leaves infected by *Exobasidium camelliae* var. *Gracilies shirai*. *American Phytopathology*, 42, 147-149.

MODIFICATIONS HISTOPATHOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES CHEZ LE MURIER (*MORUS ALBA* L.) DUES A L'INFESTATION PAR *AECIDIUM MORI* (BARCL.) SYD. ET BUTLER

G.C. VIJAYAKUMAR

Department of Botany, College of BS&H, University of Agricultural Sciences,
Bangalore - 560 065, Inde.

Des études histopathologiques et histochimiques ont été menées sur des feuilles de mûrier (Morus alba L.) de la variété Kanva-2 (M5) infestées par Aecidium mori (Barcl.) Syd. et Butler, responsable de la rouille du mûrier. Le champignon se confine en premier lieu à l'épiderme inférieur de la feuille qui présente des taches orange-jaune provoquant de graves modifications histomorphologiques du tissu mésophyllien. Les feuilles infestées s'hypertrophient et s'épaississent progressivement au stade d'infestation moyenne, on observe ensuite une diminution graduelle de l'épaississement à mesure que la maladie progresse. Le contenu en polysaccharide augmente sur les sites d'infestation moyenne. Dans les zones d'infestation forte, le nombre de grains de polysaccharide est moins élevé dans les cellules palissadiques que dans les cellules spongieuses. Les grains d'amidon s'accumulent dans les zones entourant le centre d'infestation et disparaissent progressivement au cours de la sporulation. Les protéinoplastes de grande taille des feuilles saines se désintègrent et disparaissent complètement au stade d'infestation forte. Cependant, on note une légère diminution de l'ARN dans les feuilles infestées par rapport aux feuilles saines.

INTRODUCTION

La rouille des feuilles de mûrier (*Morus alba* L.), une maladie grave provoquée par *Aecidium mori* (Barcl.) Syd. et Butler, a énormément d'importance du point de vue économique. Les feuilles infestées s'hypertrophient et se déforment ; le nourrissage des vers à soie avec de telles feuilles n'est pas nutritif (Sundareswaran *et al.*, 1988). Il n'existe pas d'études extensives qui soient proportionnées à l'impact de cette maladie sur le mûrier, seule nourriture du ver à soie.

Certaines études histologiques sur les parties affectées par la rouille ont été faites chez d'autres plantes (Wolf et Wolf, 1952) mais certaines d'entre elles sont surtout descriptives. L'objectif principal de cette étude est de déterminer le degré des modifications histopathologiques et histochimiques dans les tissus des feuilles de mûrier provoquées par l'infestation par *Aecidium mori* (Barcl.) Syd. et Butler.

MATERIELS ET METHODES

Les feuilles du cultivar (Kanva-2 ou M5) ont été cueillies au printemps 1989 dans la mûraie de Gandhi Krishi Vignana Kendra, Université des Sciences agricoles, Bangalore - 560 065, Inde. Cette plante se caractérise par des feuilles grandes, épaisses et non lobées et est une variété recommandée pour son rendement élevé en feuilles de qualité supérieure à celle des autres variétés.

Les feuilles saines et infestées sont fixées dans du Carnoy B (6 parties d'alcool éthylique + 3 parties de chloroforme + 1 partie d'acide acétique par volume) pendant une heure, déshydratées dans une séquence de bains dans l'alcool éthylique-n-butanol et incluses dans de la paraffine solide à 58 °C. Les coupes sérieées de 10 µm d'épaisseur sont colorées pour détecter les polysaccharides non

solubles suivant la méthode du réactif périodique de Schiff (PAS) (Jensen, 1962), pour localiser les protéines à l'aide du bleu de bromophénol mercurique (MBB) (Mazia et coll., 1953) et les acides nucléiques par le bleu de toluidine (Feder et O'Brien, 1968).

RESULTATS ET DISCUSSION

Histopathologie :

La feuille de mûrier se distingue, selon l'axe dorso-ventral, par un tissu de base composé d'un chlorenchyme palissadique et d'un chlorenchyme spongieux sphérique situés entre deux couches épidermiques. Les cellules palissadiques contiennent de nombreux chloroplastes. Le chlorenchyme spongieux est composé de vastes espaces intercellulaires et de moins de chloroplastes. L'épiderme supérieur est composé de plusieurs couches et est fortement cutinisé à l'extérieur. Les cystolithes sont également répartis sur l'ensemble de la couche épidermique supérieure interne.

Les modifications histologiques survenant dans les feuilles infestées sont comparées aux structures des feuilles saines (Tableau I). L'histologie des feuilles chlorotiques et asymétriques produites par les plants infestés est variable du fait de la présence d'*Aecidium mori* qui apparaît à l'intérieur de la plante et accélère la différenciation des tissus foliaires (Fig. 4).

La feuille infestée présente une hypertrophie des tissus mésophylliens entraînant une augmentation de l'épaisseur de la feuille. Ceci est dû à une augmentation de l'épaisseur du parenchyme palissadique (longueur des cellules palissadiques) et du diamètre des cellules spongieuses (Tableau I). Une telle différenciation peut avoir été causée par la production d'acide indole-acétique par l'agent pathogène (Wolf et Wolf, 1952). Dans les sites à forte infestation, les cellules sont complètement affaissées, ce qui provoque la désorganisation et la désintégration du mésophylle. L'épiderme inférieur se casse pendant la formation de poches accidiales contenant des métabolites diffus (Fig. 4). L'infestation s'étend également au faisceau vasculaire entraînant une dégradation des tissus vasculaires.

Histochimie :

On observe des modifications histochimiques significatives dues à l'infestation des plantes saines (Fig. 2, 4, 5 et 7). Le nombre de grains de polysaccharides dans les cellules palissadiques et dans les cellules spongieuses des feuilles saines est plus élevé que chez les feuilles infestées (Fig. 1). Du fait de l'infestation, la quantité d'amidon augmente au centre de la zone d'infestation moyenne (Fig. 2) et diminue fortement dans les zones à forte infestation. Ces résultats sont conformes aux résultats obtenus chez *Phaseolus vulgaris* (Mirocha et Zakia, 1966) et chez le haricot (Inmann, 1962). Dans les zones à forte infestation, le nombre et la taille des grains d'amidon diminuent dans les cellules palissadiques. On observe un déplacement net des métabolites vers la zone infestée et leur accumulation dans les zones entourant les centres d'infestation (Fig. 2). Ces modifications sont probablement en partie provoquées par les agents chimiques produits par le champignon. L'accumulation d'amidon semble en partie due à une diminution de l'activité de la β -amylase dans la zone entourant les centres d'infestation (Tanaka et Akai, 1960). Les grains d'amidon disparaissent progressivement autour du centre d'infestation pendant la sporulation (Fig. 2). Ceci suggère que les polysaccharides synthétisés sont entièrement utilisés par l'agent pathogène (Suhas et coll., 1981).

Chez les feuilles saines, les protéinoplastes des cellules palissadiques et spongieuses sont nombreux (Fig. 3). Du fait de l'infestation, on remarque une diminution de la capacité de coloration accompagnée d'une dégradation du matériel protéique dans les plastes (Fig. 4).

Dans les zones à forte infestation, il n'y a aucune trace de corps positifs protéiques ; ceci pourrait être dû à l'action de certains métabolites toxiques produits par le champignon (Fig. 5). Des travaux antérieurs sur différents végétaux révèlent que la toxine provoque des modifications radicales des synthèses protéiques (Premalata Singh, 1988 ; Vijayakumar, 1991 ; Suhas et coll., 1981).

Le contenu en ARN est élevé chez les feuilles saines mais nul dans les zones à forte infestation et les noyaux réagissent faiblement à la coloration de l'ADN (Fig. 7).

En l'absence totale d'amidon et de protéines et avec l'accumulation de certains contenus toxiques, les feuilles infestées sont non seulement moins nutritives mais affectent également de façon certaine la santé des vers à soie ; le nourrissage avec ces feuilles pouvant entraîner une diminution de

la taille des vers à soie et de mauvais résultats d'élevage. La détermination complète des agents toxiques produits par le champignon est nécessaire pour pouvoir comprendre sa pathogénicité.

PROTOPLAST ISOLATION, PURIFICATION AND CULTURE IN MULBERRY (*MORUS* SPP.)

P.K. TEWARY* & G. LAKSHMISITA**

* Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

** Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore - 560 012, India.

As part of an effort to achieve protoplast regeneration in mulberry, attempts have been made to isolate, purify and culture protoplasts from different explants of diverse commercially exploited strains. A wide range of protoplast yield was obtained when different enzymes in various concentrations and combinations were used. It culminated to 45×10^5 protoplasts/ml in the case of in vitro leaf and 95×10^5 protoplasts/ml in the case of callus when subjected to optimal conditions of enzyme combinations, incubation period, illumination, pH of the solution, centrifugation speed, etc. Viability of the isolated protoplasts was calculated about 80 % with the help of Evans blue. Both vacuolated and non-vacuolated protoplasts were obtained during the isolation and purification process but only the non-vacuolated protoplasts performed better when cultured on Murashige and Skoog (MS) liquid medium supplemented with 2 % coconut milk, 2 mg/l 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.5 mg/l benzylamino purine (BAP). A wall formation was witnessed by the changed shape of the protoplast from complete round to slightly elliptical or oblique. Cell division was evident. In some cases, protoplast budding was observed arresting further division.

Keywords : Mulberry, protoplast yield, viability, enzyme mixture.

INTRODUCTION

Mulberry is the chief plant in terms of sericulture. It is the only host plant of silkworm (*Bombyx mori* L.). Some mulberry varieties, namely S1, K2, S799 belonging to *Morus alba* species, are in commercial exploitation. These varieties have been developed through conventional breeding techniques. Although they are good leaf yielders, they lack certain desirable traits especially biotic and abiotic stress tolerance. However, in nature there is a good number of tropical and temperate varieties containing these desirable characters. Because of the erratic sex expression in mulberry, often a non-conventional approach is needed to develop elite strains clubbing leaf yield and resistance factors together using these varieties.

Protoplast culture and fusion technique can facilitate the combination of useful traits by producing somatic hybrids. Furthermore, it can also be possible to generate transgenic plants by direct DNA uptake into protoplast or by co-cultivating explants or protoplast-derived cells with *Agrobacterium* (Jaiswal *et al.*, 1990).

However, such programmes require prior understanding of isolation, culture and regeneration of plants from protoplasts. In the mulberry, not much work has been done in this regard except a few

Address for correspondence : P.K. Tewary, CSRT & TI, Srirampura, Mysore - 570008, India.

isolated reports from Japan (Ohyama and Oko, 1975 ; Katagiri, 1988, 1989 ; Ohnishi and Kiyama, 1987).

In the paper, attempts have been made to study protoplast isolation, purification and culture using seedling, leaf and callus explants of 3 different commercially exploited Indian mulberry varieties (S₁, K₂, S₇₉₉) for further plant regeneration and genetic manipulation through protoplast fusion technique.

MATERIALS AND METHODS

Three commercial varieties, S₁, K₂ and S₇₉₉, were exploited. Explants from different sources – 1) *in vitro* leaves of S₁ variety, 2) *in vivo* leaves from mature plants of K₂ variety, 3) germinating seedlings of K₂ and S₇₉₉ varieties and 4) callus obtained from stems and leaves of S₁ variety and hypocotyls and cotyledons of K₂ variety – were used.

Surface sterilization :

In the case of leaves from mature plants, young growing leaves fully unfurled (about 2 cm in size) were collected and surface-sterilized through the routine sterilization technique. After washing with teepol (detergent) for 15 minutes and then several times with tap water, the leaves were treated with 0.1 % mercuric chloride for 8 minutes and again washed 4-6 times with autoclaved water.

In the case of *in vitro* leaves, directly young leaves were clipped off from growing shoots without any sterilization. Usually shoots from 15-20 day-old aseptically grown cultures were used (Tewary and Subba Rao, 1990).

In the case of seedlings, young aseptically grown whole seedlings of about 2 weeks were taken for the purpose. Seeds were first surface-sterilized by the above-mentioned method and cultured on MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962).

In the case of calli, fresh growing calli from different explants, viz. leaf, stem, hypocotyl, cotyledon of about 2-3 weeks, after fresh subculture were preferred. In general, the calli were developed and proliferated on MS medium supplemented with 2,4-D (1-2 mg/l) and BAP (0.1 to 0.5 mg/l) (Tewary *et al.*, 1989).

Enzyme mixture :

About 1 g of explants, after surface sterilization or without surface sterilization, sliced very fine to 2 mm size pieces and incubated in 10 ml of filter-sterilized (0.22 µm nitrocellulose membrane filter) enzyme mixture containing cellulase "Onozuka" R-10, macerozyme R-10, macerase (Cal Biochem.), driselase of varying concentrations from 0.25 % to 3 % prepared in MS salts at pH 5 to 6 (preferably 5.5). 0.6 M mannitol was used as an osmoticum.

Isolation and purification :

The sliced explants were incubated in 100 ml conical flask at 25 °C on a low speed shaker (50-60 rpm) for about 12-13 hours in the dark. A 5 hour incubation was also tried. After incubation, the enzyme solution containing digested tissue was filtered through a steelmesh (60 µm in size) to discard large debris. The filtrate containing protoplasts was collected in screw cap centrifuge tubes using Pasteur pipettes and centrifuged at 50 g for 10 minutes. The supernatant containing the enzyme solution was pipetted out and the pellet containing protoplasts was floated on 20 % sucrose solution for purification. A distinct band of protoplast suspension appeared on top of the sucrose solution. The band was taken in the screw cap centrifuge tube containing about 5 ml of wash solution and washed 3 times through centrifugation. Every time the pellet was collected and the supernatant pipetted out. The wash solution used for washing purposes was prepared in MS salts with 0.6 M mannitol at pH 5.7. Mannitol was used as an osmoticum.

Viability test :

Viability of the isolated protoplasts was tested with the help of 1 % Evans blue prepared in 50 % acetone. Equal amounts of protoplast suspension and dye (one drop each) were mixed on a slide and

allowed to stain for 5 minutes. The viable protoplasts did not take stain while the dead and damaged protoplasts coloured blue in the microscope.

Culture of protoplast :

The isolated viable protoplasts were cultured in MS and half MS liquid culture media supplemented with or without 2 % coconut milk, different concentrations of 2,4-D alone (0.5 to 5 mg/l), BAP alone (0.1 to 2 mg/l) and in combinations. All the treatments contained 0.6 M mannitol as osmoticum.

Plating density was maintained between 1×10^4 to 5×10^5 /ml by counting the protoplasts with the help of a haemocytometer. The required dilution of the protoplast yield was done by adding culture medium in the centrifugation tube itself before plating in Petri dishes. About 1.5 ml and 10 ml of liquid culture medium along with the protoplast suspension was cultured in small (35 mm) and big (90 mm) plastic Petri dishes, respectively. The Petri dishes were sealed with parafilm and kept initially in the dark for 6-8 days, then brought under low light. Cultures were maintained throughout at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of an appropriate source for protoplast isolation has a great impact on further developmental stages. Irrespective of the different varieties tested, when freshly growing explants were used as a source, they yielded a fairly good amount of viable protoplasts ; however, as regards mesophyll protoplasts *in vitro* leaves were always found more promising than those of *in vivo*. Ohnishi and Kiyama (1987) have also reported that when protoplasts were isolated from a mulberry callus after subcultures, the yield decreased compared with that in the primary culture.

During the isolation and purification process, different centrifugation speeds were tried and it was observed that purification at 100 g for 10 minutes using a 20 % sucrose solution gave distinct protoplast band. For washing purposes, a 50 g speed for 5-7 minutes was found adequate (Fig. 1).

Different enzyme concentrations when used in various combinations gave low and high protoplast yields as exhibited in Table I. The optimum concentration of enzyme was found to be 2 % in the case of cellulase, 1 % in the case of macerozyme and 0.5 to 1 % in the case of macerase. Each enzyme was ineffective by itself but when used in combination with the optimal concentration it resulted satisfactorily (Evans and Bravo, 1983). For *in vitro* leaf explants, a combination of cellulase 2 %, macerozyme 1 % and macerase 1 % gave an optimum yield of 45×10^5 /ml (Fig. 2) while in the case of calli cellulase 2 % and macerozyme 1 % yielded maximum, i.e. 95×10^5 /ml (Fig. 3). For seedlings, a combination of cellulase 2 %, macerozyme 1 % and macerase 0.5 % was found most effective, giving 5×10^5 /ml protoplast yield. The combination of a lower concentration of enzymes, i.e. cellulase 0.5 % and macerozyme 0.25 %, yielded significantly low, i.e. 2×10^4 /ml for *in vitro* leaf explants, 4×10^4 /ml for calli as compared to higher concentrations. Addition of driselase could not show any appreciable increase in the yield.

Cell digestion was fairly good during the 12-13 hr incubation in the dark. However, when a shorter incubation of about 5 hrs was tried using the same enzyme combination (cellulase 2 %, macerozyme 1 %) as used in the 12-13 hr treatment, the protoplast yield was found quite low because of poor digestion. In the case of *in vitro* leaves, it was calculated 3×10^4 /ml and subsequently 8×10^4 /ml in the case of calli.

Different concentrations of mannitol ranging from 0.4 M to 0.8 M were tested and the 0.6 M concentration was found to be the right osmoticum for keeping mulberry protoplasts intact. Lower concentrations resulted in bursting of protoplasts and higher concentrations caused plasmolysis. Hence, throughout the isolation and culture process, 0.6 M mannitol was maintained. The role of pH was found significant in the media response. The enzyme mixture worked best at pH 5.5 while the wash solution and culture media showed better performances at pH 5.7.

Viability of isolated protoplasts was found sensitive to the enzyme concentration, pH, centrifugation speed, incubation period, etc. About 80 % viability was reported when optimal conditions were maintained during the isolation process (Fig. 4).

Fig. 1 : Freshly isolated protoplast from a callus obtained from a hypocotyl of K₂ mulberry variety.

× 1000.

Fig. 1 : Protoplaste nouvellement isolé à partir d'un cal de mûrier prélevé sur un hypocotyle de la variété K₂.

Grossissement : × 1 000.

Fig. 2 : Protoplast isolated from a leaf of S₁ mulberry variety.

× 200

Fig. 2 : Protoplaste isolé à partir d'une feuille de la variété de mûrier S₁.

Grossissement : × 200.

Fig. 3 : Protoplast isolated from a callus obtained from an internodal segment of S₁ mulberry variety.

× 400.

Fig. 3 : Protoplaste isolé d'un cal obtenu à partir d'un segment internodal de la variété de mûrier S₁.

Grossissement : × 400.

Fig. 4 : Viable (non stained) and non-viable (stained) protoplasts isolated from the callus.

× 400.

Fig. 4 : Protoplastes viable (non coloré) et non viable (coloré) isolés à partir du cal.

Grossissement : × 400.

Fig. 5 : Wall formation around the protoplast and further cell enlargement.

× 400.

Fig. 5 : Formation d'une paroi autour du protoplaste et croissance de la cellule.

Grossissement : × 400.

Fig. 6 : First division of the protoplast.

× 400.

Fig. 6 : Première division du protoplaste.

Grossissement : × 400.

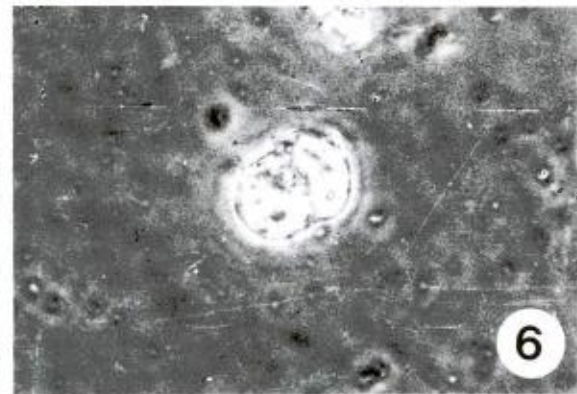


Table I. Effect of different enzyme combinations and concentrations on protoplast yield of different explants.

Tableau I. Effet de différentes combinaisons et de différentes concentrations enzymatiques sur le rendement en protoplastes de différents explants.

Explant	Cellulase "Onozuka" (%)	Macerozyme R-10 (%)	Macerase (%)	Driselase (%)	Protoplast yield ($\times 10^5$ /ml)
Explant	Cellulase "Onozuka" (%)	Macérozyme R-10 (%)	Macérase (%)	Drisérase (%)	Rendement en protoplastes ($\times 10^5$ /ml)
Leaf	0.5	0.25	-	-	0.2
Feuille	1	0.5	-	-	0.6
	1	1	-	-	10
	2	1	-	-	13
	2	1	0.5	-	0.6
	2	1	1	-	45
	2	1	-	0.5	0.5
	2	2	-	-	18
	3	2	-	-	4
Callus	0.5	0.25	-	-	0.4
Cal	1	0.5	-	-	2.5
	2	1	-	-	95
	2	2	-	-	10
Seedling	2	1	0.5	-	5
Plantule					

The cultural performance of protoplasts in MS medium comparing half MS medium was found better when supplemented with 2 % coconut milk, 2,4-D (2 mg/l) and BAP (0.1 or 0.5 mg/l). Viable protoplasts in the culture responded by showing a wall formation between 6-8 days. The wall formation was witnessed by observing the changed shape of the protoplast from complete round to slightly elliptical, oblong or oblique (Fig. 5). Out of both vacuolated and big, non-vacuolated and small protoplasts obtained during the isolation, the latter underwent a division. After about 15 days of culture, some protoplasts exhibited the first division (Fig. 6). In some cases, budding was also marked due to an incomplete wall formation during the division process, arresting subsequent growth. By maintaining proper plating density of 5×10^5 /ml, Katagiri (1989) reported the division and colony formation of mesophyll protoplasts in the exotic species, *Morus acidosa* Griff. However, a further study leading to regeneration from the protoplast callus is to be carried out by altering cultural conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The senior author (PKT) is thankful to Department of Biotechnology, New Delhi, for financial assistance under the Award of Biotechnology National Associateship. He is also thankful to the Director, CSR & TI, Berhampore, for deputing him to the Indian Institute of Science, Bangalore, during the period of the Award.

REFERENCES

- EVANS D.A., BRAVO J.E. (1983) Plant protoplast isolation and culture. International Review of Cytology, Supplement 16, 33-53.
- JAISWAL S.K., HAMMATT N., BHOJWANI S.S., COCKING E.C., DAVEY M.R. (1990) Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Brassica carinata*. Pl. Cell Tissue and Organ Culture, 22, 159-165.
- KATAGIRI K. (1988) Differences in cell division in mulberry mesophyll protoplast culture due to species and culture conditions. J. Seric. Sci. Japan, 57, 445-446.
- KATAGIRI K. (1989) Colony formation in culture of mulberry mesophyll protoplast. J. Seric. Sci. Japan, 58, 267-268.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15, 473-497.
- OHNISHI T., KIYAMA S. (1987) Increase in yield of mulberry protoplasts by treatment with chemical substance. J. Seric. Sci. Japan, 56, 407-410.
- OHYAMA K., OKO S. (1975) Isolation of protoplasts in Moraceae. Proc. Crop Sci. Soc. Japan, 44, 121-122.
- TEWARY P.K., GUPTA B.K., SUBBA RAO G. (1989) *In vitro* studies on the growth rate of callus of mulberry (*Morus alba* L.). Ind. Jor. For., 12(1), 34-35.
- TEWARY P.K., SUBBA RAO G. (1990) Multiple shoot formation through shoot apex culture of mulberry. Ind. Jor. For., 13(2), 109-111.

ISOLEMENT, PURIFICATION ET CULTURE DES PROTOPLASTES CHEZ LE MURIER (*MORUS* SPP.)

P.K. TEWARY* & G. LAKSHMISITA**

* Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, Inde.

** Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore - 560 012, Inde.

Dans le cadre d'une étude sur la régénération des protoplastes chez le mûrier, on a tenté d'isoler, de purifier et de cultiver des protoplastes de différents explants issus de plusieurs souches exploitées commercialement. Les rendements en protoplastes sont très variables selon les concentrations et combinaisons des différentes enzymes utilisées. Le rendement en protoplastes culmine à 45×10^5 protoplastes/ml dans le cas de la feuille in vitro et à 95×10^5 protoplastes/ml pour le cal lorsque sont réunies les conditions optimales pour la combinaison des enzymes, la période d'incubation, la lumière, le pH de la solution, la vitesse de centrifugation, etc. La viabilité des protoplastes isolés, mesurée par le bleu d'Evans, est de 80 %. Des protoplastes vacuolaires et non vacuolaires sont obtenus au cours du processus d'isolement et de purification mais seuls les protoplastes non vacuolaires donnent de meilleurs rendements lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu liquide Murashige et Skoog (MS) additionné de 2 % de lait de coco, 2 mg/l 2,4 acide dichlorphénoxyacétique (2,4 D) et 0,5 mg/l de 6 benzylamino purine (BAP). La formation d'une paroi est visible du fait de la modification de la forme du protoplaste, circulaire à l'origine, en forme légèrement elliptique ou oblique. La division des cellules est évidente. Dans certains cas, le bourgeonnement des protoplastes entraîne l'arrêt des divisions.

INTRODUCTION

Le mûrier est une plante primordiale en sériciculture, étant la seule plante hôte du ver à soie (*Bombyx mori* L.). Certaines variétés de mûrier de l'espèce *Morus alba*, comme S₁, K₂ et S799, sont exploitées à l'échelle commerciale. Ces variétés ont été obtenues par les techniques de sélection classiques. Bien qu'elles donnent un bon rendement en feuilles, certains caractères recherchés, comme la tolérance aux stress biotiques et abiotiques, leur font défaut. Cependant, on trouve un bon nombre de variétés dans la nature qui possèdent ces caractères recherchés. En raison de l'expression erratique du sexe chez le mûrier, il est souvent nécessaire de recourir à une approche non conventionnelle afin de développer des souches élitaires combinant les forts rendements en feuilles et la résistance au stress.

La culture et la fusion des protoplastes sont des techniques qui peuvent faciliter la combinaison des caractères utiles en permettant de produire des hybrides somatiques. De plus, il est également possible de générer des plantes transgéniques en faisant pénétrer directement l'ADN dans le protoplaste ou en co-cultivant des explants ou des cellules dérivées du protoplaste avec *Agrobacterium* (Jaiswal et coll., 1990).

Cependant, de tels programmes rendent nécessaire la compréhension préalable de l'isolement, de la culture et de la régénération des plantes issues de protoplastes. Chez le mûrier, peu de travaux ont été fait sur cet aspect à l'exception de quelques études isolées au Japon (Ohyama et Oko, 1975 ; Katagiri, 1988, 1989 ; Ohnishi et Kiyama, 1987).

Dans cet article, nous avons étudié l'isolement, la purification et la culture des protoplastes à partir d'explants de la plantule, de la feuille et du cal de 3 variétés indiennes de mûrier exploitées à l'échelle commerciale (S₁, K₂, S₇₉₉) afin d'obtenir une méthode de régénération végétale et de manipulation génétique par la technique de fusion des protoplastes.

MATERIELS ET METHODES

On a choisi trois variétés commerciales : S₁, K₂ et S₇₉₉. On a utilisé des explants provenant de différentes sources : 1) de feuilles *in vitro* de la variété S₁, 2) de feuilles *in vivo* de plants matures de la variété K₂, 3) de plantules en germination des variétés K₂ et S₇₉₉ et 4) de cal issus de tiges et de feuilles de la variété S₁ et d'hypocotyles et de cotylédons de la variété K₂.

Stérilisation de la surface :

Dans le cas des feuilles issues de plants matures, de jeunes feuilles totalement déployées (d'une taille d'environ 2 cm) ont été ramassées et leur surface a été stérilisée suivant la méthode standard de stérilisation. Après lavage avec du Teepol (détergent) pendant 15 minutes puis dans l'eau ordinaire plusieurs fois, les feuilles sont traitées avec 0,1 % de chlorure de mercure pendant 8 minutes puis lavées à nouveau 4 à 6 fois dans de l'eau stérilisée à l'autoclave.

Dans le cas des feuilles *in vitro*, de très jeunes feuilles ont été sectionnées sur des pousses en pleine croissance sans stérilisation. On utilise normalement des pousses de 15 à 20 jours cultivées en milieu aseptique (Tewary et Subba Rao, 1990).

Dans le cas des plantules, on a choisi de jeunes plantules entières cultivées en milieu aseptique et âgées d'environ deux semaines. La surface des graines d'abord été stérilisée suivant la méthode décrite ci-dessus et cultivées sur le milieu MS de base (Murashige et Skoog, 1962).

Dans le cas des cals, on a sélectionné des cals en formation issus de différents explants, à savoir : de la feuille, de la tige, de l'hypocotyle et du cotylédon, d'environ 2 à 3 semaines juste après la sous-culture. En général, les cals sont développés sur le milieu MS additionné de 2,4-D (1-2 mg/l) et de BAP (0,1 à 0,5 mg/l) (Tewary et coll., 1989).

Mélange d'enzymes :

Environ 1 g d'explants, dont la surface a été stérilisée ou non, est coupé en fines lamelles de 2 mm et incubé dans 10 ml d'un mélange enzymatique stérilisé par filtration (filtre de nitrocellulose à pores de 0,22 µm) composé de cellulase "Onozuka" R-10, de macérozyme R-10, de macérase (Cal Biochem.) et de driselase à des concentrations de 0,25 % à 3 % préparées dans une solution saline MS, pH 5 à 6 (de préférence 5,5). Le mannitol 0,6 M est utilisé comme régulateur osmotique.

Isolement et purification :

Les lamelles d'explants sont incubées dans un becher de 100 ml à 25 °C dans un agitateur lent (50 à 60 tours/minute) pendant 12 à 13 heures dans l'obscurité. Une incubation de 5 heures a également été essayée. Après incubation, la solution enzymatique contenant le tissu digéré est filtrée à travers une toile en acier (taille : 60 µm) pour éliminer les débris les plus gros. Le filtrat contenant les protoplastes est recueilli dans des tubes à centrifuger à couvercle vissant à l'aide de pipettes Pasteur et centrifugé à 50 g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant la solution enzymatique est éliminé à l'aide d'une pipette et le culot contenant les protoplastes est déposé sur une solution de sucrose à 20 % pour purification. Une bande distincte de suspension de protoplastes apparaît à la surface de la solution de sucrose. La bande est déposée dans un tube à centrifuger à couvercle vissant contenant environ 5 ml d'une solution de lavage et lavée trois fois par centrifugation. Chaque fois, le culot est prélevé et le surnageant éliminé à l'aide d'une pipette. La solution de lavage utilisée est préparée dans du MS contenant 0,6 M mannitol, pH 5,7.

Test de viabilité :

La viabilité des protoplastes isolés est testée avec 1 % de bleu d'Evans dilué dans de l'acétone à 50 %. Des quantités égales de suspensions de protoplastes et de teinture (une goutte pour chaque

suspension) sont mélangées sur une lame et laissées à colorer pendant 5 minutes. Les protoplastes viables ne se colorent pas tandis que les protoplastes morts ou endommagés prennent une teinte bleue visible au microscope.

Culture des protoplastes :

Les protoplastes viables isolés sont cultivés sur des milieux de culture liquides MS et semi-MS additionnés ou non de 2 % de lait de coco, de différentes concentrations de 2,4-D seul (0,5 à 5 mg/l), de BAP seul (0,1 à 2 mg/l) ou en combinaison. Tous les traitements contiennent du mannitol 0,6 M comme régulateur osmotique.

La densité est maintenue entre 1×10^4 et 5×10^5 /ml en comptant les protoplastes à l'aide d'un hémocytomètre. La dilution voulue en protoplastes est faite par addition du milieu de culture dans le tube de centrifugation avant déposition dans les boîtes de Pétri. Environ 1,5 ml et 10 ml de milieu de culture liquide contenant la suspension de protoplastes sont cultivés dans des boîtes de Pétri en plastique respectivement de 35 mm et de 90 mm. Les boîtes de Pétri sont scellées avec un parafilm ; elles sont ensuite conservées dans l'obscurité pendant 6 à 8 jours puis placées en semi-obscurité. Les cultures sont conservées pendant la durée de l'expérience à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

RESULTATS ET DISCUSSION

La sélection d'une source appropriée de protoplastes influe fortement sur les stades de développement ultérieurs. Quelles que soient les variétés testées, les jeunes explants en formation, lorsqu'ils sont utilisés comme source, produisent un assez grand nombre de protoplastes viables. Cependant, pour ce qui concerne les protoplastes du mésophylle, les feuilles *in vitro* donnent toujours de meilleurs résultats que les feuilles *in vivo*. Ohnishi et Kiyama (1987) ont également observé que, lorsque les protoplastes sont isolés à partir d'un cal de mûrier issu de sous-cultures, le rendement est inférieur à celui de la culture primaire.

Au cours des processus d'isolement et de purification, on a testé différentes vitesses de centrifugation et on a pu observer que la purification à 100 g pendant 10 minutes à l'aide d'une solution de sucrose à 20 % donne une bande de protoplastes distincte. Pour le lavage, la vitesse optimale est de 50 g pendant 5 à 7 minutes (Fig. 1).

Comme le montre le tableau I, différentes concentrations d'enzymes donnent des rendements faibles et élevés suivant les combinaisons utilisées. La concentration optimale d'enzymes est de 2 % pour la cellulase, 1 % pour le macérozyme et 0,5 à 1 % pour la macérase. Utilisées seules, les enzymes sont inefficaces mais combinées avec la concentration optimale, elles donnent des résultats satisfaisants (Evans et Bravo, 1983). Pour les explants de feuilles *in vitro*, une combinaison de 2 % de cellulase, de 1 % de macérozyme et de 1 % de macérase permet un rendement optimal de 45×10^5 /ml (Fig. 2) ; pour le cal, on obtient un rendement maximal de 95×10^5 /ml avec 2 % de cellulase et 1 % de macérozyme (Fig. 3). Pour les plantules, la combinaison la plus efficace est de 2 % de cellulase, 1 % de macérozyme et 0,5 % de macérase avec un rendement de 5×10^5 /ml. Les combinaisons d'enzymes à des concentrations plus faibles, soit 0,5 % de cellulase et 0,25 % de macérozyme, donne un rendement nettement inférieur : 2×10^5 /ml pour les explants de feuilles *in vitro*, 4×10^4 /ml pour le cal. L'addition de driselase ne fait apparaître aucune augmentation marquée du rendement.

La digestion des cellules se fait assez bien pendant les 12 à 13 heures d'incubation dans l'obscurité. Cependant, pour la même combinaison d'enzymes, le rendement en protoplastes est très faible lorsque la durée d'incubation dans l'obscurité est ramenée à environ 5 heures en raison d'une mauvaise digestion. On a calculé qu'il était de 3×10^4 /ml pour les feuilles *in vitro* et de 8×10^4 /ml pour les cals.

Différentes concentrations de mannitol variant de 0,4 M à 0,8 M ont été testées ; la concentration de 0,6 M constitue le meilleur régulateur osmotique pour conserver les protoplastes de mûrier intacts. Le pH joue un rôle significatif dans la réaction aux milieux. Le mélange enzymatique donne les meilleurs résultats avec un pH de 5,5 tandis que la solution de lavage et les milieux de culture donnent de meilleurs rendements avec un pH de 7,7.

La viabilité des protoplastes isolés dépend de la concentration d'enzymes, du pH, de la vitesse de centrifugation, de la période d'incubation, etc. On observe une viabilité d'environ 80 % lorsque les conditions optimales sont maintenues pendant toute la durée du processus d'isolement (Fig. 4).

Le rendement en protoplastes dans un milieu MS est meilleur que sur un demi milieu MS lorsque le milieu est additionné de 2 % de lait de coco, de 2,4-D (2 mg/l) et de BAP (0,1 ou 0,5 mg/l). Les protoplastes viables de la culture réagissent en formant une paroi dans les 6 à 8 jours. La formation d'une paroi est indiquée par la modification de la forme du protoplasme, circulaire à l'origine, qui prend une forme légèrement elliptique ou oblique (Fig. 5). Au cours de l'isolement, on obtient deux types de protoplastes : l'un est de grande taille et vacuolaire et l'autre est de petite taille et non vacuolaire. On observe que les protoplastes du second type subissent une division : après environ 15 jours de culture, certains protoplastes présentent la première division (Fig. 6). Dans certains cas, on note également un bourgeonnement dû à une formation incomplète de la paroi au cours du processus de division, entraînant un arrêt de la croissance. Katagiri (1989) a observé, en maintenant une densité d'accumulation adaptée de 5×10^5 /ml, une division et la formation d'une colonie de protoplastes du mésophylle chez l'espèce exotique *Morus acidosa* Griff. Une étude conduisant à la régénération à partir du cal de protoplasme par modification des conditions de culture est en projet.

WET REELING OF DABA COCOONS WITH AN IMPROVED CHARAKHA

S. DAS¹ & S.K. CHOWDHURY*

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi - 834 005, Bihar, India.

* Silk Conditioning and Testing House, Malda - 732 101, West Bengal, India.

Daba (Antheraea mylitta D.) cocoons were found completely cooked at boil in 1 % H₂O₂ (W/V) with 1 % Sunlight soap at pH 10.82 within 5 minutes. Comparative reeling was performed on CTRS pedal-operated machine and on improved CSR & TI charakha with daba cocoons. The wet reeling performances of grey and yellow colours of daba cocoons were evaluated on the improved CSR & TI charakha. The raw silk percentage of daba cocoons reeled on CTRS machine was 57.80 % whereas, with the improved charakha, the raw silk percentage increased to 65.00 %. Mechanical testing further revealed that the quality of raw silk obtained from the improved charakha was better than the raw tasar silk of CTRS pedal-operated machine.

Keywords : *Antheraea mylitta* D., cooking, wet reeling, raw silk percentage.

INTRODUCTION

At present, daba cocoons are cooked by boiling in a solution of 1 g/l soap and 1 g/l soda for 30 minutes followed by steam pressurisation for 45 minutes and finally soaked with 0.5 g/l of Biopril-50 solution for about 16-18 hours, initially at a temperature of 45 °C and later at room temperature. They are reeled in the dry basin of a pedal-operated CTRS machine (Jolly and Sonwalkar, 1974). If reeling of these cocoons is tried in water basin, cocoon silk turns into a lump (Chowdhury, 1988). Due to loss of a sufficient quantity of sericin on account of prolonged steaming or enzyme treatment, the intricate crossings of reelable filament get devoid of cohesion. As a result, the bunch of reelable loops and slugs often comes off from the cocoons in the course of reeling and forms thick slubby patches in the yarn (Chowdhury, 1988).

In the present work, daba cocoons were cooked within 5 minutes in a solution of 1 % H₂O₂ (30 % W/V) with 1 % Sunlight soap and productivity of the reeling basin was increased with the improved CSR & TI charakha. The technological properties of the wet reeled tasar yarn are also encouraging.

MATERIALS AND METHODS

The cocoons of *Antheraea mylitta* D. harvested from rearings on *Terminalia arjuna*, as already reported (Jolly *et al.*, 1968), were stifled in a hot air oven at 80 °C for 14 hours. The stifled cocoons were boiled in a solution of 1 % H₂O₂ (30 % W/V) with 1 % Sunlight soap for 5 minutes at a pH of 10.82. The boiling of cocoons was also carried out without using H₂O₂. The reeling was conducted under sunken condition with grey and yellow daba cocoons in a hot water basin at 80 °C. The wet

1. Present address : Central Silk Technological Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore - 560 068, India.

reeling of grey daba cocoons was also carried out in a basin prepared with a 0.1 % sodium carbonate solution at 60 °C. The pH of the bath was 8.00. The grey daba cocoons were also cooked as per the Biopril-50 method and reeled in the dry basin of the pedal-operated CTRS machine.

CTRS pedal-operated machine (Jolly and Sonwalkar, 1974) and CSR & TI improved charakha (1985) were employed to determine the comparative raw silk percentages for daba cocoons according to the following formula :

$$\text{Cocoon raw silk \%} = \frac{\text{Conditioned silk weight (g)} + \text{Converted cocoon with yield (g)}}{\text{Weight of the cocoons (g)}} \times 100$$

Converted cocoon with yield (g) = cocoon filament weight (g) × no. of converted carry over cocoons.

$$\text{No. of converted carry over cocoons} = 1.00 P + 0.80 H + 0.28 M + 0.06 L$$

where,

P = No. of newly cooked cocoons not reelable.

H = No. of heavy shell unreelable cocoons or carry over cocoons.

M = No. of middle shell unreelable cocoons or carry over.

L = No. of light shell unreelable cocoons or carry over.

Mechanical tests of silk samples were performed at the Silk Testing Laboratory of CSR & TI, Berhampore.

RESULTS

Cocoon properties :

A considerable variation was found in *A. mylitta* cocoons in respect of cocoon size, colour and toughness. The cocoon size varied from 4.86 × 2.84 cm to 4.96 × 2.91 cm. Two colours were observed : grey and yellow. The average cocoon weight was noted to be 12 g and average shell weight was 1.2 g.

Cocoon cooking :

The stifled daba cocoons, when immersed in a solution of 1 % H₂O₂ (30 % W/V) and 1 % Sunlight soap (pH 10.82) at boil, were found completely cooked within 5 minutes. In the absence of hydrogen peroxide, the grey and yellow daba cocoons remained uncooked.

Cocoon reeling :

It was not possible to undertake the ordinary brushing upon the cooked cocoons due to the delicate texture at the peduncle ends of *A. mylitta*. Hence, deflossing of individual cocoons was performed with the fingers. Single cocoon reeling with an eprouvette showed an average filament length of 720 m. The average filament size was observed to be 10 deniers. Reeling of *A. mylitta* cocoons was carried out on the existing pedal-operated CTRS machine by comparison with the improved charakha. The raw silk percentage of cocoons reeled on CTRS machine was only 57.80 % whereas with the improved charakha, the raw silk percentage was found to be 65 % as shown in Table I.

Mechanical testing of raw silk :

The *A. mylitta* raw silk obtained after reeling on CTRS machine was compared with the raw silk obtained from the improved CTR & TI charakha. It can be seen from Table II that alkaline cooking combined with the CSR & TI charakha improved tenacity, cohesion strokes, neatness and cleanness for both grey and yellow daba cocoons. The cohesion stroke and neatness characters of yellow daba cocoons were found to be superior to those of the grey variety when reeling was performed in a hot water basin. The same improved charakha with the soda-reeled method was also found more useful than the water-reeled method in improving the qualities of *A. mylitta*.

Table I. Comparative reeling performance of *A. mylitta*.Tableau I. Performance comparative du dévidage d'*A. mylitta*.

Sl no.	Treatment	Raw silk (%)
N° de série	Traitement	Soie grège (%)
1	T-1	65.08
2	T-2	65.02
3	T-3	65.00
4	T-4	57.80

Table II. Comparative mechanical test results of *A. mylitta*.Tableau II. Résultats comparatifs des tests mécaniques chez *A. mylitta*.

Sl no.	Treatment	Cohesion (stroke)	Tenacity (g/d)	Elongation (%)	Neatness (%)	Cleanness (%)
N° de série	Traitement	Cohésion (coups)	Ténacité (g/d)	Elongation (%)	Netteté (%)	Propreté (%)
1	T-1	5.17	2.02	14.40	73.50	95.63
2	T-2	120.83	2.79	22.67	86.00	96.14
3	T-3	10.33	1.96	18.45	77.50	94.99
4	T-4	Nil	1.57	18.66	55.00	68.50

T-1 : Grey daba cocoons (water-reeled at 80 °C) on CSR&TI charakha / Cocons gris daba (dévidés dans l'eau à 80 °C) sur la charkha du CSR&TI.

T-2 : Grey daba cocoons (soda-reeled at 60 °C) on CSR&TI charakha / Cocons gris daba (dévidés dans de la soude à 60 °C) sur la charkha du CSR&TI.

T-3 : Yellow daba cocoons (water-reeled at 80 °C) on CSR&TI charakha / Cocons jaunes daba (dévidés dans l'eau à 80 °C) sur la charkha du CSR&TI.

T-4 : Grey daba cocoons (dry-reeled under semi-moist condition) on CTRS machine / Cocons gris daba (dévidés à sec en milieu semi-humide) sur la bassine du CTRS.

DISCUSSION

No systematic work has been done regarding the mass wet reeling of *A. mylitta* cocoons on the improved charakha. In the present work, the raw silk percentage of daba cocoons was found to increase when reeling was conducted on the improved CSR & TI charakha. It was observed that the filament from cocoons cooked with hydrogen peroxide and Sunlight soap had good agglutination and lustre unlike the filaments from enzymatically cooked cocoons. The tenacity of Biopril-50 treated silk is only 1.57 g/d and cooking with sodium carbonate has been reported to be between 1.3-1.4 g/d (Das, 1990). The tenacity of wet reeled tasar silk after cooking with hydrogen peroxide and Sunlight soap in this work was observed to be between 1.96-2.79 g/d. The elongation of Biopril-50 cooked cocoons was shown as 18.6 % in dry reeling, whereas an elongation of 14.40-22.67 % was noticed in the present system of cooking and subsequent wet basin reeling technique. The elongation of 22.67 % achieved in experiment no. 2 is an improvement over the earlier works (Bahl *et al.*, 1988).

In CTRS pedal-operated machine, the filaments are taken to a top delivery roller through a thread guide and, after taking a turn round the delivery roller, are twisted with the rotation of the traveller around the ring before being finally wound on the bobbins fixed on the spindle. It was observed that the twist in the reeled yarn is not only insufficient but also non-uniform. Hence, production of raw silk from the CTRS machine remains considerably low because of the time wasted in re-reeling. In CSR & TI improved charakha, the silk reeled on small reels is re-reeled on the standard reels with a common fly wheel. There are five reeling ends in the improved charakha unlike four ends in CTRS pedal-operated machine. The additional reeling end and increased velocity of thread production per minute in the charakha were helpful in increasing the productivity of the basin in this work. The improved technological properties of the grey daba cocoons reeled in a sodium carbonate bath may be due to the swelling and subsequent re-distribution of gummy materials present in silk during the time of reeling.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr G. Subba Rao, Director, for extending co-operation to carry out testing in CSR & TI, Berhampore. Thanks are due to Mr Marcos and Mr James Tirkey for being extremely helpful in mass reeling.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1985) Improved charakha. Central Silk Board, Bangalore, Silk Extension Bull., 9.
 BAHL R.K., PANDEY R.K. (1988) Wet reeling of oak tasar cocoons with improved charakha. *Sericologia* 28(3), 403-410.
 DAS S. (1990) Wet reeling of tasar cocoons. *Indian Silk*, 28(11), 13-14.
 CHOWDHURY S.K. (1988) Wet reeling of tasar cocoons to improve the tasar raw silk production and its quality. *Indian Silk*, 27(1), 24-33.
 JOLLY M.S., CHATURVEDI S.N., PRASAD S.A. (1968) Survey of tasar crops in India. *Indian J. Seric.*, 1, 50-58.
 JOLLY M.S., SONWALKAR T.N. (1974) Improved reeling technique for tasar cocoons. Central Silk Board, India, 7 p.

DEVIDAGE HUMIDE DES COCONS DABA SUR UNE CHARKHA PERFECTIONNEE

S. DAS¹ & S.K. CHOWDHURY*

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi - 834 005, Bihar, Inde.

* Silk Conditioning and Testing House, Malda - 732 101, West Bengal, Inde.

*Des cocons daba (*Antheraea mylitta* D.) peuvent être entièrement cuits par ébullition dans une solution à 1 % de H₂O₂ (P/V) contenant 1 % de savon, pH 10,82, en 5 minutes. Un dévidage comparatif des cocons daba a été réalisé sur une machine à pédale du CTRS et une charkha perfectionnée du CSR & TI. Les performances du dévidage humide des cocons daba gris et jaunes ont été estimées sur la charkha. Le pourcentage de soie grège des cocons daba dévidés sur la machine du CTRS est de 57,80 % alors qu'il passe à 65,00 % avec la charkha perfectionnée. Les tests mécaniques révèlent également que la qualité de la soie grège obtenue à partir de la charkha perfectionnée est meilleure que celle de la soie tasar obtenue sur la machine à pédale du CTRS.*

INTRODUCTION

Les cocons daba sont habituellement cuits par ébullition dans une solution contenant 1 g/l de savon et 1 g/l de soude pendant 30 minutes puis sous pression de vapeur pendant 45 minutes et enfin trempés dans une solution contenant 0,5 g/l de Biopril-50 pendant environ 16 à 18 heures, initialement à une température de 45 °C puis à température ambiante. Ils sont dévidés dans la bassine sèche d'une machine à pédale du CTRS (Jolly et Sonwalkar, 1974). Si le dévidage est réalisé dans une bassine contenant de l'eau, la soie de ces cocons se met en boule (Chowdhury, 1988). En raison d'une quantité insuffisante de sérécine résiduelle perdue à la cuisson à la vapeur ou au traitement enzymatique, les filaments dévidables emmêlés perdent leur cohésion ; de ce fait, des boucles dévidables et des bouchons se détachent fréquemment du cocon au cours du dévidage, entraînant la formation de noeuds épais dans le fil (Chowdhury, 1988).

La cuisson des cocons daba pendant 5 minutes dans une solution contenant 1 % de H₂O₂ (30 % P/V) et 1 % de savon et l'utilisation de la charkha perfectionnée du CSR & TI permet d'améliorer la productivité de la bassine de dévidage. Les propriétés technologiques du fil tasar dévidé dans l'eau sont également encourageantes.

MATERIELS ET METHODES

Des cocons d'*Antheraea mylitta* D., récoltés dans des élevages sur *Terminalia arjuna*, suivant la méthode de Jolly et coll. (1968), ont été étouffés dans un four à air chaud à 80 °C pendant 14 heures. Les cocons étouffés ont été ébouillantés dans une solution contenant 1 % H₂O₂ (30 % P/V) et 1 % de savon, pH 10,82, pendant 5 minutes. Des cocons ont également été ébouillantés en l'absence de H₂O₂.

1. Adresse actuelle : Central Silk Technological Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore - 560 068, Inde.

Le dévidage des cocons daba gris et jaunes a été réalisé par immersion dans une bassine d'eau chaude à 80 °C. Le dévidage humide des cocons daba gris a également été réalisé dans une bassine contenant une solution de carbonate de sodium à 0,1 % à 60 °C. Le pH du bain était de 8,00. Des cocons daba gris ont également été cuits avec la préparation enzymatique Biopril-50 et dévidés sur la machine à pédale du CTRS.

La machine à pédale du CTRS (Jolly et Sonwalkar, 1974) et la charkha perfectionnée du CSR & TI (1985) ont été utilisées pour déterminer les pourcentages de soie grège dévidée pour les cocons daba à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Soie grège (\%)} = \frac{\text{Poids de soie conditionnée (g) + Cocon converti avec le rendement (g)}}{\text{Poids des cocons (g)}} \times 100$$

Cocon converti avec le rendement (g) = poids du filament du cocon (g) × nombre de cocons convertis reportés.

$$\text{Nombre de cocons convertis reportés} = 1,00 P + 0,80 H + 0,28 M + 0,06 L$$

Où :

P = nombre de cocons cuits non dévidables,

H = nombre de cocons non dévidables à coque lourde ou cocons reportés,

M = nombre de cocons non dévidables à coque moyenne ou reportés,

L = nombre de cocons non dévidables à coque légère ou reportés.

Les tests mécaniques des échantillons de soie ont été effectués au Silk Testing Laboratory du CSR & TI, Berhampore.

RESULTATS

Propriétés des cocons :

Une variation considérable chez les cocons d'*A. mylitta* a été observée pour ce qui concerne la taille, la couleur et la dureté. La taille du cocon varie de 4,86 × 2,84 cm à 4,96 × 2,91 cm. Deux couleurs ont été observées : gris et jaune. Le poids moyen du cocon est de 12 g et le poids moyen de la coque de 1,2 g.

Cuisson des cocons :

Lorsqu'ils sont immergés dans une solution à 1 % de H₂O₂ (30 P/V) et 1 % de savon (pH 10,82) en ébullition, les cocons daba étouffés sont entièrement cuits en 5 minutes. En l'absence de peroxyde d'hydrogène, les cocons daba gris et jaunes ne cuisent pas.

Dévidage des cocons :

Il n'a pas été possible de pratiquer le brossage habituel des cocons cuits en raison de la texture délicate des extrémités des pédoncules d'*A. mylitta*. Le déblazage des cocons individuels a donc été fait manuellement. Le dévidage individuel des cocons donne une longueur de filament moyenne de 720 m. Le titre moyen du filament est de 10 deniers. Le dévidage des cocons d'*A. mylitta* a été réalisé sur la machine à pédale du CTRS par comparaison avec la charkha perfectionnée. Le pourcentage de soie grège des cocons dévidés sur la machine du CTRS est de 57,80 % seulement alors qu'il est de 65 % avec la charkha perfectionnée, comme le montre le tableau I.

Tests mécaniques de la soie grège :

La soie grège d'*A. mylitta* obtenue après dévidage sur la machine du CTRS a été comparée à celle obtenue sur la charkha perfectionnée du CSR & TI. Le tableau II montre que la cuisson alcaline combinée à la charkha du CSR & TI permet d'améliorer la ténacité, la cohésion, la netteté et la propreté des cocons daba gris et jaunes. Les caractères cohésion et netteté des cocons daba jaunes sont

supérieurs à ceux de la variété grise lorsque le dévidage est effectué dans une bassine d'eau chaude. Cette même charkha perfectionnée permet d'obtenir de meilleurs résultats avec la méthode du dévidage dans de la soude qu'avec la méthode de dévidage dans l'eau.

DISCUSSION

Aucune étude systématique n'a été faite sur le dévidage humide en masse des cocons d'*A. mylitta* avec la charkha perfectionnée. Dans cette étude, le pourcentage de soie grège des cocons daba augmente lorsque le dévidage est effectué sur la charkha perfectionnée du CSR & TI. Le filament des cocons cuits dans du peroxyde d'hydrogène et du savon a une bonne cohésion et un bon lustre à la différence des filaments issus de cocons cuits aux enzymes. La ténacité de la soie traitée au Biopril-50 est seulement de 1,57 g/d et il a été observé que celle obtenue après la cuisson avec du carbonate de sodium se situe entre 1,3 et 1,4 g/d (Das, 1990). Dans cette étude, la ténacité de la soie tasar dévidée dans l'eau après cuisson au peroxyde d'hydrogène et au savon varie de 1,96 à 2,79 g/d. L'élongation des cocons cuits avec du Biopril-50 est de 18,6 % après dévidage à sec, tandis que l'on observe une élongation de 14,40 à 22,67 % avec le système de cuisson et la technique de dévidage dans l'eau décrits ici. L'élongation de 22,67 % obtenue dans l'expérience n° 2 constitue une amélioration par rapport aux travaux antérieurs (Bahl et coll., 1988).

Avec la machine à pédale du CTRS, les filaments sont passés sur un cylindre délivreur en haut de la machine à travers un distributeur de fil, et après enroulement d'un tour sur le cylindre délivreur, sont tordus par la rotation du convoyeur autour de la bague avant d'être enroulés sur les bobines fixées au fuseau. Il a été observé que la torsion du fil dévidé est non seulement insuffisante mais également irrégulière. Aussi la productivité avec la machine du CTRS reste-t-elle extrêmement faible en raison du temps perdu à redévider le fil. Avec la charkha perfectionnée du CSR & TI, la soie dévidée sur de petits dévidoirs est redévidée sur des dévidoirs standards avec une roue volante commune. Il y a cinq bouts sur la charkha perfectionnée contre quatre bouts sur la machine à pédale du CTRS. Dans cette étude, l'addition d'un bout supplémentaire et l'augmentation de la rapidité de production de fil avec la charkha permettent d'optimiser la productivité de la bassine. L'amélioration des propriétés technologiques des cocons daba gris dévidés dans un bain de carbonate de sodium pourrait être due au gonflement et à la redistribution subséquente au moment du dévidage de la matière gommeuse présente dans la soie.

GENETIC VARIABILITY OF AMYLASE ACTIVITY IN THE MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., AND ITS SIGNIFICANCE

S.N. CHATTERJEE*, C.G.P. RAO, G.K. CHATTERJEE & S.K. ASWATH

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

*To generate information on the variability of amylase in Indian races and other exotic breeds of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, and its role on the expression of yield components, the activity of amylase in the haemolymph and digestive juice was measured spectrophotometrically after Bernfeld (1955), using V instar larvae consequent to the 10th, 12th and 15th feeding. Existence of high and low amylase activity in the blood of non-hibernating (low yield) as also hibernating (high yield) silkworm breeds did not show any apparent relationship between enzyme activity and yield parameters.*

In the digestive system, the enzyme activity was found to be higher in the later stage of development, i.e. consequent to the 15th feeding in V instar, the stage of the maximum feeding activity. Further, Indian traditional breeds were found to have the highest activity followed by Indian evolved breeds and Chinese breeds of low yield. The activity was found to be much lower in evolved high yielding bivoltine breeds of India and univoltine breeds of Europe and Japan.

The enzyme activity analysed for V instar showed a significant negative correlation with the larval weight, larval duration, weight of cocoon and cocoon shell, but a strong positive correlation ($r = + 0.47$ and $+ 0.81$, respectively for the 10th and 15th feeding sets) with the effective rate of rearing, a measure of survival in sericulture. The regression of the paired characters was also worked out and the significance of the observation with reference to hardiness of indigenous multivoltine mulberry silkworms is discussed.

Keywords : Silkworm, amylase, genetic variability.

INTRODUCTION

The genetic variability of various enzymes has been studied in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, by Japanese scientists (Yoshitake, 1963 ; Eguchi *et al.*, 1972 ; Tazima, 1978). Gamo (1983) attempted to correlate specific biochemical and/or genetical parameters with those contributing to yield. Of such biochemical traits, amylase may be considered as one of the most well-worked out enzyme system in *Bombyx mori* (Matsumura, 1951 ; Tazima, 1964 ; Hara *et al.*, 1984, 1986). However, very little information is available on the tropical races in general and silkworm races of India in particular.

* To whom correspondence should be addressed.

The study of amylase has a further relevance to the understanding of the robustness of silkworms, as indicated by Gamo (1983) on the basis of the works earlier carried out by Japanese scientists. This aspect is very important to the Indian silk industry (Chatterjee and Datta, 1989 ; Datta, 1988).

Thus an attempt has been made to evaluate in detail the genetic variability of amylase activity in Indian silkworm breeds and breeds of other countries maintained at the institute. The objective is to ascertain the range of variability of amylase activity in tropical races/breeds of India and its relevance to the geographic distribution as proposed earlier by Matsumura (1951) as well as to find out whether this variability is related with the yield of cocoons and cocoon characters. This report confirms the significant positive correlation ($r = +0.47$ to $+0.81$) of digestive amylase activity with the survival of silkworms, but a negative correlation with other economic traits.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm races used :

The races included in the study are : i) traditional low yielding polyvoltine races (Nistari, Sarupath, Moria, Nistid and Pure Mysore) ; ii) polyvoltine races with improved cocoon characters evolved during the last ten years (G-race, Kollegal Jawan, Mysore Princess, Tamilnadu White, Hosa Mysore) ; iii) a number of high yielding breeds or combinations having bivoltine/univoltine origin collected from other sericultural countries and iv) a few high yielding breeds developed during the last ten years. The materials also included some genetic marker stocks (e.g. 'Lemon', 'Chocolate' and 'Red Egg').

Rearing of silkworms :

The silkworm rearing was done as detailed in Krishnaswami (1978) and each race/breed/combination was reared in replicated design using a minimum number of 10-12 layings. The layings were brushed *en masse* and, in 3rd instar, they were replicated with 300-400 larvae in rearing trays of 2 × 3 ft. The feeding was given either 3 or 4 times a day.

Evaluation of yield parameters :

The yield parameters considered were : weight of matured larva (g), span of larval life (days), weight of single cocoon (g), weight of single shell (g) and effective rate of rearing (%).

$$\text{Effective rate of rearing (ERR \%)} = \frac{\text{No. of cocoons harvested}}{\text{No. of larvae kept in each replication}} \times 100$$

For each replication, 10 female and 10 male larvae and cocoons were individually assayed using Fisher's electronic balance with a printer and the computed mean was used for that particular replication.

Collection of samples :

All samples were collected 2-3 hrs after the 12th or 15th feeding in the V instar if not otherwise stated. The haemolymph was collected in chilled Eppendorf tubes in the presence of thiourea by cutting one of the prolegs. For the collection of the digestive juice two methods were employed :

(i) the larvae were kept with tobacco leaves (Chatterjee *et al.*, 1988) and the juice was collected by pressing the head lightly on the rim of the tube ;

(ii) keeping the head lightly pressed between two fingers, the maxillary part was rubbed against the rim of the tube and this made the larvae ooze out the digestive juice.

No difference was found in the enzyme activity using the samples collected by either of the processes. The use of chloroform was avoided because of instantaneous vomiting and smearing on other larvae. For each sample 10 larvae were used and for each race 3 samples were collected.

Following the procedure standardised earlier in the laboratory (Chatterjee *et al.*, 1988), the enzyme activity was assayed for each replication of samples in 3 separate test tubes and for each test

tube 2 ml of starch solution (2 mg/ml, pH 6.8) was used as a substrate for 20 μ l of blood or digestive juice. The incubation was done at 37 °C for 30 min. and the reaction was stopped by adding 2 ml of 3,5 dinitrosalicylic acid (E. Merck, Art. no. 800141). The colour was developed by keeping the mixture in boiling water for 5 min. and the reading was taken after the mixture was cooled down. The absorbance was noted at 525 nm and the concentration was estimated on the basis of standard curve of maltose. The amylase activity is expressed as mg of maltodextrin released/ 30 min./20 μ l of sample.

For each replication of a race, a minimum of 5 $\times$ 2 enzyme assays were made, the absorbances were transformed into concentrations of maltose and the mean concentration was used as an index of activity for that particular replication for a race/breed.

Statistical analysis :

All the statistical analyses were done using the computerised statistical programme for ANOVA and regression analysis.

RESULTS

Primary analysis of amylase activity in blood and digestive juice :

Results of the primary analysis of amylase activity in the larval blood and digestive juice after the 12th feeding in the V instar (using 4 feeds/day) for a few selected races/breeds are shown in Fig. 1a,b. The characteristics of these races are presented in Table I, in three groups on the basis of cocoon weight (cocoon weight up to 1.109 g ; 1.110-1.400 g and 1.6-2.0 g). In the context of the sericulture industry, these three groups may be considered as representative of low, medium and high yielding breeds.

The activity of amylase in the haemolymph was found to vary from 0.178 mg (in NB7) to 0.37 mg of maltodextrin released/30 min./20 μ l of haemolymph (in CC₁). The variability is of continuous nature (Fig. 1a) as generally observed for quantitative traits under polygenic control. The enzymes (Fig. 1a) in the digestive juice also revealed a wide range of activity, ranging from 0.04 mg in NB7 to 0.398 in Nistari and, in general, the Indian tropical multivoltine races revealed a higher activity than the high yielding 'bivoltine races'.

Perusal of cocoon characters and larval life span, (see Table I) with reference to the enzyme activity presented in Fig. 1a, clearly shows that the total range of amylase activity in the haemolymph cannot be subdivided on the basis of high- or low-yield groups, e.g. : NB7, a high yielding breed, and the low yielding race Nistid show almost similar activities (0.178 and 0.193, respectively). Likewise, Nistari and Kalimpong A (KA) revealed the same range of amylase activity (0.234 and 0.238 mg, respectively) in the haemolymph. The data further show that a high activity of amylase in the haemolymph is not always accompanied with a similar high activity in the digestive juice or the reverse. As, for example, the high enzyme activity in the digestive juice for Nistari is accompanied with a moderately low activity in the haemolymph.

Although no apparent relationship could be observed between the enzyme activity in the haemolymph with the yield parameters, such a relationship is apparent for the enzyme activity in the digestive juice. Comparison of the activity presented in Fig. 1b with the yield characteristics (Table I) clearly indicates that the low yielding tropical multivoltine breeds/races (Nistari, Sarupath, PCN and C' nichii) have a high enzyme activity while the activity is much lower for high yielding breeds laying hibernating eggs. Thus the status of amylase in the blood and in the digestive juice differs significantly with respect to their possible relationship with the yield index. These observations led the authors to further investigate the variability of amylase activity in the digestive juice and its possible significance for yield potential for different breeds of multivoltine silkworms.

Analysis of digestive amylase activity in various geographical races/breeds :

Results of the estimation of the amylase activity for a large number of races/breeds of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, are presented in Fig. 2. The assay was done at fixed times, i.e. subsequent to the 10th or 15th feeding in the V instar (3 feeds/day) under 2 different experimental setups. The estimation of enzyme activity was accompanied with the estimation of yield parameters

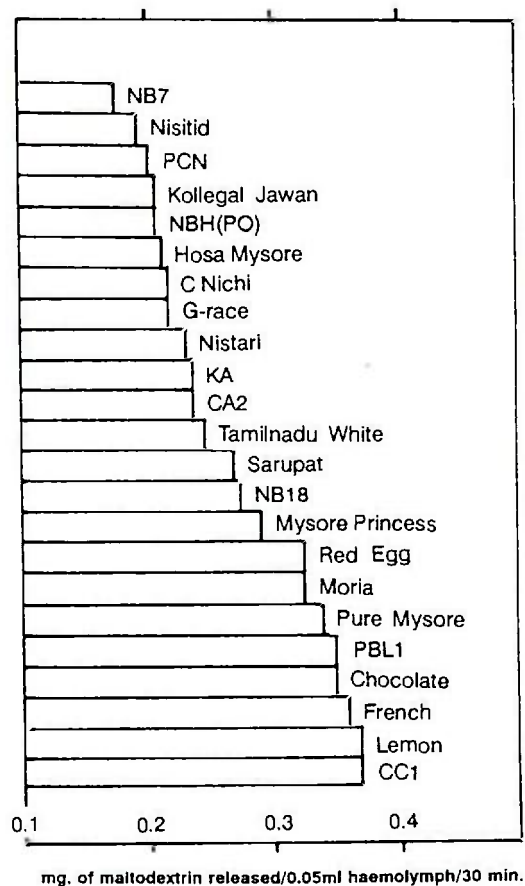


Fig. 1a.

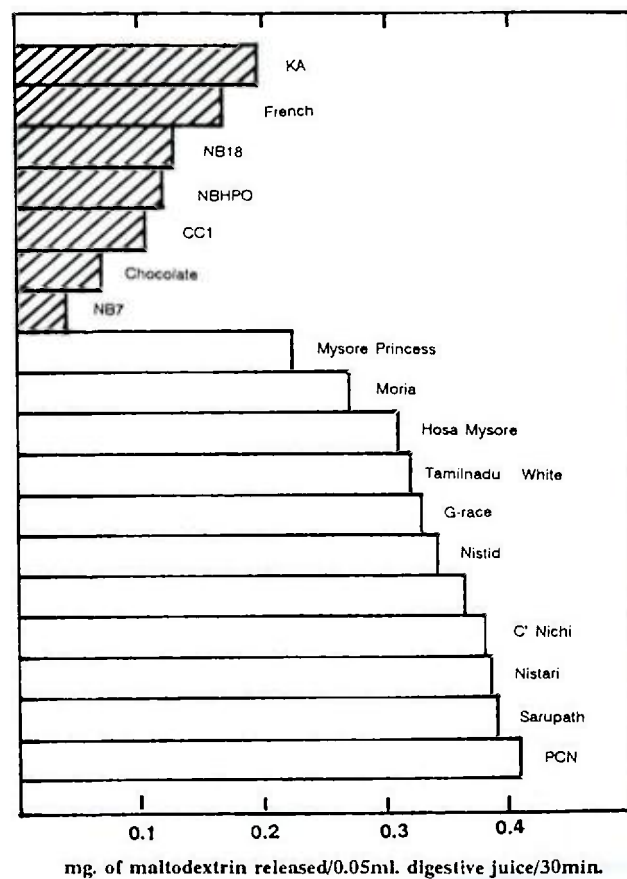


Fig. 1b.

Fig. 1a, b : Bar-chart for amylase enzyme activity in the haemolymph (a) and digestive juice (b) of V instar larvae of selected bivoltine and multivoltine breeds of *Bombyx mori*.

The details of the breeds mentioned herein are given in Table I. The activity is expressed as mg of malto-dextrin released/30 min./20 µl of haemolymph or digestive juice.

Fig. 1a, b : Histogramme de l'activité enzymatique amylase dans l'hémolymph (a) et le suc digestif (b) des larves du 5e âge de souches de *Bombyx mori* bivoltines et polyvoltines sélectionnées.

Les caractéristiques des souches présentées ci-dessus sont données dans le tableau I. L'activité est exprimée en mg de malto-dextrine libérées en 30 minutes pour 20 µl d'hémolymph ou de suc digestif.

Table I. Cocoon characters and estimates of other metric traits characterising low, medium and high yielding breeds.

Tableau I. Caractères du cocon et évaluation d'autres traits quantitatifs caractérisant les souches à faible rendement, à rendement moyen et à haut rendement.

Breed/ race	Egg type H/NH	Larval marking	Cocoon shape	Cocoon colour	Average estimates of					Amylase activity	
					Larval weight (g)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)	ERR %	Blood (mg/20 µl/30 min.)	Digestive juice (mg/20 µl/30 min.)
Souche ou race	Type d'oeuf H/NH	Marquage larvaire	Forme du cocon	Couleur du cocon	Evaluations moyennes de					Activité de l'amylase	
					Poids larvaire (g)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Longueur filament (m)	ERR (%)	Sang (mg/20 µl/30 min.)	Suc digestif (mg/20 µl/30 min.)
Nistari	NH	M	S	Goy	20.7	1.104	0.101	475	93.07	0.234	0.388
Pure Mysore	NH	P	-do-	Gry	20.4	0.956	0.138	396	95.79	0.342	NR
Nistid	NH	P	-do-	Gry	17.2	1.105	0.145	381	94.04	0.193	0.343
Moria	NH	P	O	W	20.1	0.925	0.131	434	85.85	0.328	0.272
Sarupat	NH	P	-do-	CW	24.1	1.002	0.131	528	86.79	0.271	0.392
PCN	H/NH	M	E	Gry	18.6	1.096	0.163	373	92.81	0.206	0.411
C'nichi	NH	P	DB	W	17.8	0.926	0.103	390	89.14	0.218	0.383
Lemon	H	P	DB	W	20.6	0.991	0.147	NR	74.92	0.371	NR
Red egg	H	P	-do-	W	20.6	0.859	0.114	NR	67.64	0.327	NR
Average / Moyenne					20.0	0.996	0.130	425.3	86.67	0.277	0.365

NH : Non hibernating / Non diapausant.

H : Hibernating / Diapausant.

M : Marked / Marqué.

P : Plain / Uni.

NR : Not recorded / Non relevé.

E : Elliptical / Elliptique.

DB : Dumbbell / Ceintré.

S : Spindle / Poinu.

O : Oval / Ovale.

ERR : Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage.

CW : Creamish white / Blanc crème.

Goy : golden yellow / Jaune d'or.

Gry : Greenish yellow / Jaune-vert.

W : White / Blanc.

Continued / Suite page suivante.

Table Continued / Tableau I. Suite

Breed/ race	Egg type H/NH	Larval marking	Cocoon shape	Cocoon colour	Average estimates of					Amylase activity	
					Larval weight (g)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Filament length (m)	ERR %	Blood (mg/20 µl/30 min.)	Digestive juice (mg/20 µl/30 min.)
Souche ou race	Type d'oeuf H/NH	Marquage larvaire	Forme du cocon	Couleur du cocon	Evaluations moyennes de					Activité de l'amylase	
					Poids larvaire (g)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Longueur filament (m)	ERR (%)	Sang (mg/20 µl/30 min.)	Suc digestif (mg/20 µl/30 min.)
G race	NH	M	O	Goy	24.6	1.339	0.187	600	86.33	0.219	0.331
K. Jawan	NH	P	-do-	W	26.4	1.359	0.207	650	82.17	0.210	0.365
T. White	NH	P	-do-	CW	23.4	1.128	0.163	567	82.31	0.246	0.322
MPs	NH	P	-do-	W	27.5	1.279	0.221	500	74.14	0.292	0.225
HM	NH	P	-do-	Gry	23.4	1.196	0.188	NR	87.20	0.214	0.312
French	H	P	DB	W	23.4	1.211	0.215	800	63.64	0.362	0.168
Chocolate	H	P	O	W	23.5	1.161	0.205	NR	69.42	0.355	0.069
Average / Moyenne					24.6	1.239	0.198	623.4	77.89	0.271	0.256
KA	H	P	O	W	34.7	1.854	0.355	957	73.34	0.238	0.197
NB7	H	P	-do-	-do-	32.1	1.831	0.378	1050	78.06	0.178	0.037
NB18	H	P	DB	-do-	33.0	1.941	0.408	977	77.27	0.277	0.128
CA2	H	P	O	-do-	38.0	1.981	0.435	1080	79.55	0.240	NR
PBL1	H	M	-do-	-do-	31.0	1.530	0.341	NR	67.96	0.354	NR
CC1	H	P	-do-	-do-	37.5	1.925	0.422	1014	71.80	0.372	0.105
NBHP0	H	P	-do-	-do-	34.0	1.626	0.341	NR	70.17	0.212	0.120
Average / Moyenne					34.3	1.812	0.383	1015.6	74.02	0.267	0.117

NH : non hibernating / Non diapausant.

H : hibernating / Diapausant.

M : Marked / Marqué.

P : Plain / Uni.

NR : Not recorded / Non relevé.

E : Elliptical / Elliptique.

DB : Dumbbell / Ceinuré.

S : Spindle / Pointu.

O : Oval / Ovale.

ERR : Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage.

CW : Creamish white / Blanc crème.

Goy : golden yellow / Jaune d'or.

Gry : Greenish yellow / Jaune-vert.

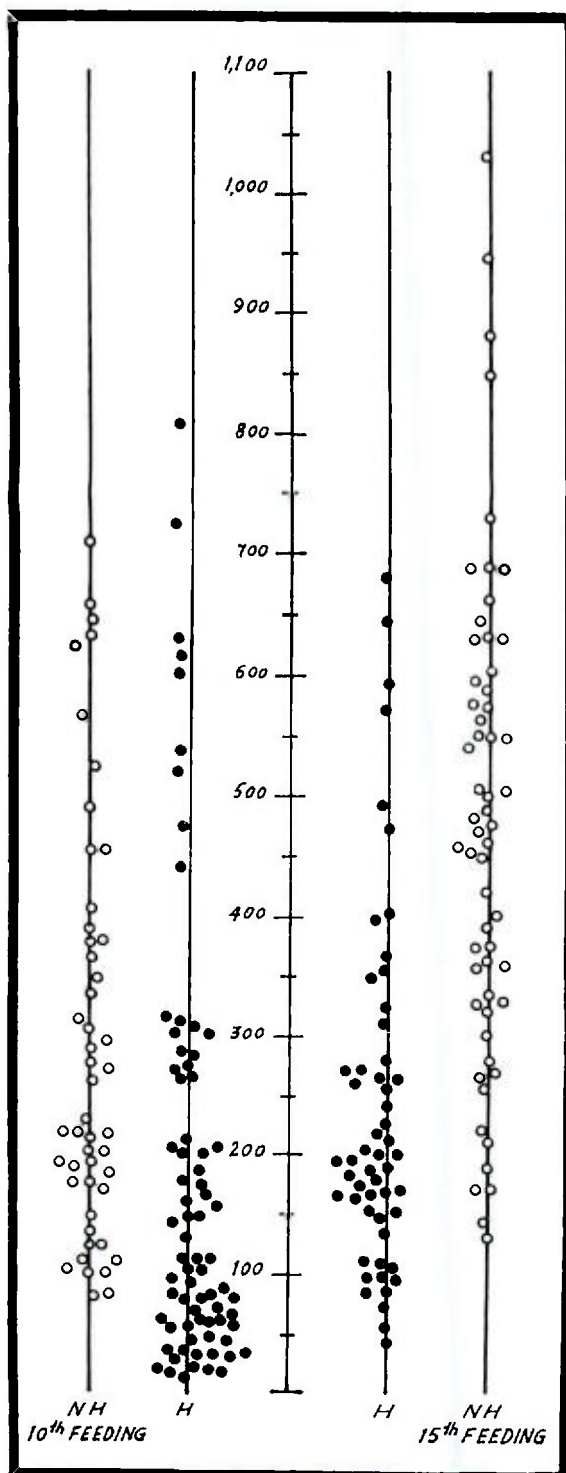
W : White / Blanc.

Fig. 2 : Distribution of the activity of the amylase enzyme in the digestive juice subsequent to the 10th and 15th feedings in the V instar of *Bombyx mori*.

H and NH represent the genetic stocks laying hibernating and non-hibernating eggs. The scale represents the 0-1100 mg of maltodextrin released/30 min./20 μ l of digestive juice.

Fig. 2 : Distribution de l'activité amylase dans le suc digestif après le 10e et le 15e nourrissage au 5e âge de *Bombyx mori*.

H et NH correspondent aux stocks génétiques donnant des oeufs diapausants et non diapausants. L'échelle indique les quantités de maltodextrine de 0 à 1100 mg libérées en 30 minutes pour 20 μ l de suc digestif.



as indicated in Materials and Methods. The data presented in Fig. 2 confirm the observations made in earlier studies (Table I) and further support the association of higher amylase activity for silkworm breeds of the non-hibernating egg group. However, to understand this aspect, the races/breeds included under 'hibernating/non-hibernating' groups were further classified as per the geographic origin of the material (Table II) which also include the estimates of four yield components analysed.

Table II. Average comparative data on digestive amylase activity vis-à-vis quantitative traits in different types of silkworm breeds.

Tableau II. Données comparatives moyennes de l'activité de l'amylase digestive en fonction des différents types de souches de vers à soie.

Races	10th feeding amylase (μ g)	15th feeding amylase (μ g)	Larval weight (g)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	ERR (%)	Larval duration (days)
	Mean range	Mean range	Mean range	Mean range	Mean range	Mean range	Mean range
<i>Races</i>	<i>Amylase au 10e nourrissage (μg)</i>	<i>Amylase au 15e nourrissage (μg)</i>	<i>Poids larvaire (g)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Taux effectif d'élevage (%)</i>	<i>Durée larvaire (jours)</i>
	<i>Fourchette moyenne</i>	<i>Fourchette moyenne</i>	<i>Fourchette moyenne</i>	<i>Fourchette moyenne</i>	<i>Fourchette moyenne</i>	<i>Fourchette moyenne</i>	<i>Fourchette moyenne</i>
Non hibernating / Non diapausantes							
Indian traditional <i>Indiennes traditionnelles</i>	213.5 101.5-408	576.8 488.2-701.7	20.1 17.2-24.1	0.925 0.794-1.018	0.134 0.091-0.161	89.15 81.07-94.73	22.5 21.16-27.83
Indian evolved <i>Indiennes nouvelles</i>	333.1 118.0-705.4	469.3 174.2-772.8	23.6 19.9-26.4	1.221 1.075-1.359	0.172 0.125-0.207	88.00 76.25-92.93	23.66 22.83-25.5
Hibernating / Diapausantes							
Chinese <i>Chinoises</i>	301.9 65.2-693.7	396.7 220.4-510.8	18.0 15.8-19.8	0.929 0.879-1.110	0.149 0.125-0.193	75.1 69.5-89.3	25.83 23.83-28.83
Japanese <i>Japonaises</i>	191.4 63.7-576.2	191.2 86.1-279.4	35.0 31.5-37.4	1.449 1.360-1.618	0.316 0.248-0.366	76.5 71.2-80.6	27.00 26.5-28.00
European <i>Européennes</i>	118.4 18.4-159.3	221.9 106.8-347.7	24.3 20.6-26.5	1.128 0.990-1.399	0.181 0.128-0.233	73.8 66.6-92.3	26.83 26.00-28.66
Indian <i>Indiennes</i>	50.7 30.0-64.9	198.8 98.1-270.6	34.9 32.1-38.0	1.906 1.831-1.981	0.399 0.355-0.435	77.16 73.34-79.3	28.5 26.5-28.66
Others <i>Autres</i>	135.5 35.3-331.8	163.3 49.0-264.3	25.1 16.9-34.0	1.252 1.002-1.626	0.251 0.213-0.341	60.8 49.2-74.8	27.83 26.5-28.33

It is evident from the data presented in Table II that the traditional Indian non-hibernating breeds and races have the highest amylase activity in the digestive juice for the early and late stages followed by that of evolved Indian breeds. Chinese hibernating stocks also showed a higher activity closer to the evolved multivoltine breeds. Hibernating stocks with a higher yield potential originated from Japan, Europe, and other countries revealed much lower amylase activity indices than those observed for others.

The evaluation of the yield parameters showed that the Indian traditional races/breeds (non-hibernating) are the lowest in larval weight and shell weight, but higher in ERR % than the others. The Japanese and European races have an almost similar amylase activity to that of the Indian bivoltine breeds evolved.

To test the relationship of the amylase activities in the digestive juice in early or late V instar larvae, a simple correlation analysis was done. Results (Table III) clearly show a strong positive correlation between digestive amylase and survival and the correlation is very high for the amylase activity in the 15th feeding ($r = +0.806$). On the other hand, all the other four parameters including larval duration reflect a high negative correlation with the digestive amylase activity.

Table III. Relationship between amylase enzyme and other yield parameters.

Tableau III. Relation entre l'amylase et d'autres paramètres du rendement.

		Larval weight	Larval duration	Cocoon weight	Shell weight	ERR %
		<i>Poids larvaire</i>	<i>Durée larvaire</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Taux effectif d'élevage</i>
10th feeding / 10e nourrissage						
Amylase vs	r^*	-0.600	-0.708	-0.633	-0.684	+0.474
	byx	-0.040	-0.015	-0.002	-0.007	+0.044
	bxy	-9.062	-32.46	-187.8	-701.9	+5.016
15th feeding / 15e nourrissage						
Amylase vs	r^*	-0.957	-0.675	-0.618	-0.724	+0.806
	byx	-0.013	-0.028	-0.001	-0.004	+0.047
	bxy	-70.96	-416.47	-296.5	-1201.3	+13.791

r : Correlation coefficient / Coefficient de corrélation.

byx : Regression of y on x / Régression de y sur x.

bxy : Regression of x on y / Régression de x sur y.

* All values were found significant at $p > 0.01$ / Toutes les valeurs sont significatives à $p > 0,01$.

DISCUSSION

The data presented in this report once more confirm the presence of a wide range of variability in the expression of amylase in the haemolymph of *Bombyx mori*. However, the significance of the variability observed for amylase activity in the haemolymph cannot be properly explained. Nonetheless, the present result clearly shows that the enzyme activity in the haemolymph has no apparent relation with the cocoon characters or survival of silkworms.

Activity of various 'hydrolases' and 'oxydoreductases' has been demonstrated in various insect groups (Rockstein, 1974), but the actual function of amylase in the haemolymph could not be explained earlier by others (Tanaka and Kushano, 1980). However, Wyatt (1967) suggested that amylase in the insect haemolymph probably helps in the degradation of glycogen in the haemolymph. But till now in the silkworm, no further information is available on the possible relationship between amylase activity and the glycogen metabolism.

Regarding the relation between the level of amylase activity in the haemolymph and digestive juice, the data presented in this report suggest that one is independent from the other. This also corroborates in general the earlier proposition made by Matsumura and his collaborators (Yokoyama, 1959).

As reported by Yokoyama (1959), Matsumura and his collaborators presented that high enzyme activity in the haemolymph is accompanied with either high or low enzyme activity in the digestive and *vice versa*. However, it was claimed by them that tropical multivoltines have a high activity for both the haemolymph and the digestive juices. The present data do not support the contention, as combination of both high and low amylase activity in the haemolymph was observed for different tropical multivoltine breeds of India (Fig. 1 and 2).

Matsumura and others presented amylase activity either as 'low' or 'high'. But a later work of Gamo (1983) showed that the enzyme activity may also be in intermediate range. According to Moon and Seol (1983) and Hara *et al.* (1986), amylase enzyme activity in the digestive juice could be grouped into discrete variability ranges. Comparing observations presented by the Japanese workers, Moon and Seol (1983) classified the enzyme activities into six groups which can be further divided into three ranges: 0-10, 16-48 and 95-100 enzyme activity index. Similarly, Hara *et al.* (1986) also showed the possibility of classifying the activity ranges of digestive amylase into four classes: very high activity: 20000-26000, high activity: 12000, medium activity: 4000-8000 and very low: 10-15 mg/ml. The present data clearly show that it is not possible to divide the range into discrete groups and the variability is more of a continuous nature, similar to that observed for any other quantitative trait. Inheritance study by backcross analysis (Chatterjee *et al.*, unpublished) also showed a segregation pattern for amylase similar to that realised for traits like 'cocoon weight', 'shell weight' or 'larval weight'. It is of further interest to indicate that the gene for digestive amylase was mapped in linkage 8:2.8. But the unpublished updated linkage map received from Doira's lab shows amylase in the digestive system also linked with linkage no. 18. However, the exact map position was not indicated. All these suggest the need for further biometrical analysis towards estimating the minimum number of gene loci involved in digestive amylase activity.

The apparent association of the activity of amylase in the digestive juice with cocoon characters induced a good deal of studies and its genetic variability (Hirata, 1974; Kanekatsu, 1973, 1978; Hara *et al.*, 1984, 1986). Hirata (1974) analysed the relation between amylase activity in the larval digestive juice and several quantitative characters using bivoltine strains with high and low digestive amylase activity. His results showed higher cocoon weight, cocoon shell weight, shell %, cocoon shell productivity/day in the V instar and survival rate for larvae with a high amylase activity. Further, the significance of the difference was more apparent when larvae were fed with hardened leaves or artificial diet.

Moon and Seol (1983) also used 11 breeds to analyse the effect of amylase activity on the cocoon characters and tried to study the effect of pre-treatment of larvae with 0.1 % α -amylase on the development of larvae. The study indicated that the body weight is reduced with the increase of amylase concentration in the food.

In the present study, different geographical races/breeds with varying cocoon characters were used. No correlation analysis using such a large number of strains was done earlier. Studies of Hirata

(1974) and others were mostly dependent on the Japanese and Chinese bivoltine breeds, whereas the present study includes multivoltine as well as bivoltine and univoltine breeds of Chinese, Japanese and European origin.

Indigenous multivoltine breeds are well known for their higher adaptability to tropical conditions and low nutritive quality of the traditional Indian mulberry varieties. The present result also suggests a positive role of the digestive amylase in contributing towards hardiness as generally observed in these breeds. However, it is not possible to predict any direct or indirect pathways of the contributory role of the digestive amylase. It only suggests the importance of carbohydrate metabolism in the silkworm with special reference to hardiness.

Horie (1961) demonstrated the activities of many carbohydrates in midgut tissues but in the digestive fluid only amylase was found to be very active ; however, he did not try to explain the association observed between the digestive amylase activity and the yield parameters. With regard to the nature of the enzyme, Kanekatsu (1978) has shown that the enzyme is positively analogous to α -amylase of other animal origin.

The present work clearly suggests the need for analysing other enzymes in the digestive juice and their possible relationship with yield parameters in silkworms. It is also apparent that an in-depth study on sugar metabolism in silkworms may be useful for understanding the contribution of amylase enzyme toward survival and faster rate of development (Table II). Summarily, the results presented in this report indicate the possibility of using digestive amylase as a marker for breeding towards improving survival of commercial high yielding breeds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge an active support and encouragement from Dr K. Sengupta, Director, CSRTI, Berhampore, and Dr R.K. Datta, Director, CSRTI, Mysore. Also indebted to Central Silk Board for financial assistance and other colleagues for their critical evaluation/constructive criticism of the work.

REFERENCES

- BERNFELD P. (1955) Methods in enzymology. Academic Press, New York, 1, 149-157.
- CHATTERJEE S.N., CHATTERJEE G.K., NAIDU W.D. (1988) Genetic variation of digestive juice amylase in bivoltine and multivoltine races. CSRTI Newsletter, 3(1), 5.
- CHATTERJEE S.N., DATTA R.K. (1989) The growth and importance of biotechnology : An overview. Indian Silk, 28, 60-67.
- DATTA R.K. (1988) Report of task force on bivoltine sericulture development. Central Silk Board, Bangalore, India.
- EGUCHI M., FURUKAWA S., IWAMOTO A. (1972) Proteolytic enzyme in the midgut of the pharate adult of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 18, 2457-2467.
- GAMO T. (1983) Biochemical genetics and its application to the breeding of the silkworm. JARQ, 16(4), 264-273.
- HARA W., FUJII H., SAKAGUCHI B. (1984) Activity and polymorphism of digestive juice amylase in various strains of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 53(6), 496-500.
- HARA W., FUJII H., SAKAGUCHI B. (1986) The *ae* locus and the genes controlling the cathodal amylase isozymes of digestive juice in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 55(2), 147-152.
- HIRATA Y. (1974) Relations between the amylase activity of the larval digestive juice and several quantitative characters in *ae* strain of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 43(5), 384-390.
- HORIE Y. (1961) Physiological studies on the alimentary canal of the silkworm, *Bombyx mori*. III. Absorption and utilisation of carbohydrates. Bull. Sericult. Exp. Sta., 16(5), 287-309.
- KANEKATSU R. (1973) Purification and some properties of amylase in the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 42(4), 285-292.
- KANEKATSU R. (1978) Studies on further properties for an alkaline amylase in the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Faculty Textile Sci. Tech. Shinshu Univ., 76, 1-21.

- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Bulletin no. 2, Central Silk Board, Bangalore, India.
- MATSUMURA S. (1951) On the functional difference of the digestive amylase of different strains of the silkworm, *Bombyx mori* L. Bull. Sericult. Exp. Sta. Japan, 13, 513-519.
- MOON J.Y., SEOL G.Y. (1983) Varietal difference in amylase activity of larval digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori*. Seric. J. of Korea, 24(2), 73-80.
- ROCKSTEIN M. (1974) In The physiology of Insecta. Acad. Press, New York.
- TANAKA Y., KUSANO T. (1980) The haemolymph amylase activity during development of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci. Japan, 49(2), 95-99.
- TAZIMA Y. (1964) In The genetics of the silkworm. Logos Press, London, 31-32.
- TAZIMA Y. (1978) In The silkworm : An important laboratory tool. Kodansha Ltd., Tokyo, Japan.
- WYATT G.R. (1967) The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. Adv. Insect Physiol., 4, 287-360.
- YOKOYAMA T. (1959) In Silkworm genetics illustrated. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, 129-134.
- YOSHITAKE N. (1963) On the esterase types in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci. Japan, 32, 285-291.

VARIABILITE GENETIQUE DE L'ACTIVITE AMYLASE CHEZ LE VER A SOIE DU MURIER *BOMBYX MORI* L. ET SA SIGNIFICATION

S.N. CHATTERJEE, C.G.P. RAO, G.K. CHATTERJEE & S.K. ASWATH

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

*Afin d'obtenir des informations sur la variabilité de l'amylase chez les races indiennes et les autres souches exotiques du ver à soie **Bombyx mori** ainsi que sur son rôle dans l'expression des composants du rendement, on a mesuré l'activité de l'amylase dans l'hémolymph et le suc digestif par spectrophotométrie selon la méthode de Bernfeld (1955) chez des larves du 5e âge prélevées après le 10e, le 12e et le 15e nourrissement. La présence d'activités faibles et élevées de l'amylase dans le sang des souches de vers à soie non-hibernantes (faible rendement) et hibernantes (haut rendement) ne révèle aucune corrélation apparente entre l'activité enzymatique et les paramètres du rendement.*

Dans le système digestif, l'activité enzymatique est plus élevée au dernier âge du développement, c'est-à-dire après le 15e nourrissement au 5e âge, stade auquel l'alimentation est maximale. On observe également que les souches indiennes traditionnelles ont l'activité la plus élevée, suivies des souches isolées indiennes et des souches chinoises à faible rendement. L'activité est beaucoup plus faible chez les souches bivoltines à haut rendement mises au point en Inde et les souches monovoltines d'Europe et du Japon.

L'activité enzymatique analysée pour le 5e âge est en corrélation négative avec le poids larvaire, la durée larvaire, le poids du cocon et le poids de la coque, mais en corrélation positive et forte ($r = +0,47$ et $+0,81$ respectivement pour les lots du 10e et du 15e nourrissement) avec le taux effectif d'élevage, mesure de la survie en sériciculture. Nous avons étudié la régression pour les différents caractères deux à deux et la signification des observations concernant la robustesse des vers à soie du mûrier polyvoltins indigènes est discutée.

INTRODUCTION

La variabilité génétique de divers enzymes a été étudiée chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori*, par des chercheurs japonais (Yoshitake, 1963 ; Eguchi et coll., 1972, Tazima, 1978). Gamo (1983) a tenté d'établir une corrélation entre les paramètres biochimiques et/ou génétiques et les paramètres contribuant au rendement. Parmi ces caractères biochimiques, l'amylase peut être considérée comme l'un des systèmes enzymatiques les mieux compris chez *Bombyx mori* (Matsumura, 1951 ; Tazima, 1964, Hara et coll., 1984, 1986). Cependant, il y a peu de documentation sur les races topicales en général et les races indiennes en particulier.

L'étude de l'amylase contribue également à la compréhension de l'origine de la robustesse chez les vers à soie, comme l'a montré Gamo (1983) en se basant sur des travaux réalisés par des chercheurs japonais. Cet aspect est très important pour l'industrie indienne de la soie (Chatterjee et Datta, 1989 ; Datta, 1988).

On a donc tenté d'évaluer en détail la variabilité génétique de l'activité de l'amylase chez les souches de vers à soie indiennes et les souches d'autres pays maintenues à l'institut. L'objectif est de mettre en évidence l'amplitude de la variabilité de l'activité amylase chez les races/souches tropicales d'Inde et une relation avec la répartition géographique suivant la méthode suggérée par Matsumura (1951) et également de déterminer si cette variabilité est liée au rendement en cocons et aux caractères du cocon. Cette étude confirme la corrélation positive significative ($r = + 0,47$ à $0,81$) entre l'activité de l'amylase digestive et la survie des vers à soie mais révèle une corrélation négative avec les autres caractères économiques.

MATERIELS ET METHODES

Races de vers à soie utilisées :

Les races utilisées sont : 1) les races polyvoltines traditionnelles à faible rendement (Nistari, Sarupath, Moria, Nistid et Pure Mysore), 2) les races polyvoltines à caractères du cocon améliorés isolées au cours des dix dernières années (G-race, Kollegal Javan, Mysore Princess, Tamilnadu White, Hosa Mysore), 3) un certain nombre de souches ou combinaisons à haut rendement d'origine bivoltine/monovoltine provenant d'autres pays séricicoles et 4) quelques souches à haut rendement isolées au cours des dix dernières années. Le matériel comprend également quelques souches à marqueur génétique (par exemple : "Citron", "Chocolat" et "Oeuf rouge").

Elevage des vers à soie :

L'élevage des vers à soie a été fait selon la méthode de Krishnaswami (1978) et chaque race/souche/comboinaison a été élevée en réplicats comprenant un minimum de 10 à 12 pontes. Les pontes ont été levées en masse et, au 3^e âge, elles ont été réparties en réplicats de 300 à 400 larves dans des litières de 2 x 3 pieds. Le nourrissage est fait 3 ou 4 fois par jour.

Evaluation des paramètres du rendement :

Les paramètres du rendement considérés sont : poids de la larve mature (g), durée larvaire (jours), poids d'un cocon (g), poids d'une coque (g) et taux effectif d'élevage (%).

$$\text{Taux effectif d'élevage (\%)} = \frac{\text{Nombre de cocons récoltés}}{\text{Nombre de larves par réplicat}} \times 100$$

Pour chaque réplicat, 10 larves femelles et 10 larves mâles ont été pesées individuellement à l'aide d'une balance électronique Fisher reliée à une imprimante et la moyenne enregistrée constitue la moyenne du réplicat.

Prélèvement des échantillons :

Tous les échantillons ont été prélevés 2 à 3 heures après le 12^e et le 15^e nourrissage au cinquième âge, sauf indication contraire. L'hémolymph est prélevée dans des tubes Eppendorf réfrigérés en présence de thiourée en sectionnant l'une des fausses pattes.

Pour le prélèvement du suc digestif, on a employé deux méthodes :

- 1) les larves ont été maintenues avec des feuilles de tabac (Chatterjee et coll., 1988) et le suc a été prélevé en serrant légèrement la tête de la larve contre le bord du tube ;
- 2) tout en maintenant la tête de la larve serrée entre deux doigts, la partie maxillaire a été frottée contre le bord du tube, faisant ainsi régurgiter le suc digestif par la larve.

On ne constate aucune différence de mesure de l'activité enzymatique entre les deux méthodes de prélèvement. L'utilisation du chloroforme a été évitée car elle entraîne un vomissement immédiat et un salissement des autres larves. Pour chaque échantillon, 10 larves ont été utilisées et, pour chaque race, 3 échantillons ont été prélevés.

La mesure de l'activité enzymatique, réalisée suivant le protocole déjà standardisé en laboratoire (Chatterjee et coll., 1988), a été effectuée pour chaque réplicat d'échantillon dans trois éprouvettes

séparées contenant chacune 2 ml d'une solution d'amidon (2 mg/ml, pH 6,8) utilisée comme substrat pour 20 µl de sang ou de suc digestif. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 30 minutes et la réaction a été arrêtée par addition de 2 ml d'acide 3,5 dinitrosalicylique (E. Merck, Art. n° 800141). La coloration a été développée en maintenant le mélange dans l'eau bouillante pendant 5 minutes et les lectures ont été effectuées après refroidissement du mélange. La densité optique est enregistrée à 525 nm et la concentration est estimée en fonction de la courbe standard du maltose. L'activité de l'amylose est exprimée en mg de maltodextrine libérés/30 minutes/20 µl d'échantillon.

On a fait un minimum de 5×2 dosages enzymatiques pour chaque réplicat d'une race, les absorptions sont transformées en concentrations de maltose, la concentration moyenne servant d'indice d'activité pour un réplicat donné de race/souche.

Analyse statistique :

Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide d'un logiciel de statistiques pour l'analyse de variance et l'analyse de régression.

RESULTATS

Analyse primaire de l'activité amylose dans le sang et dans le suc digestif :

Les résultats de l'analyse primaire de l'activité de l'amylose dans le sang et le suc digestif des larves après le 12^e nourrissage au 5^e âge (à raison de 4 nourrissons par jour) pour quelques races/souches sélectionnées sont présentés dans la Fig. 1a,b. Les caractéristiques de ces races, réparties en trois groupes en fonction du poids du cocon (poids du cocon jusqu'à 1,109 g, de 1,110 à 1,400 g et de 1,6 à 2,0 g), sont données dans le tableau I. Dans le contexte de l'industrie séricicole, ces trois groupes peuvent être considérés comme représentatifs des souches à rendement faible, moyen et élevé.

L'activité amylose dans l'hémolymphe varie de 0,178 mg (chez NB7) à 0,37 mg de maltodextrine libérées/30 minutes/20 µl d'hémolymphe (en CC1). La variabilité est de nature continue (Fig. 1a) comme on peut l'observer de manière générale pour les caractères quantitatifs sous contrôle polygénique. Les enzymes (Fig. 1a) du suc digestif révèlent une variabilité de l'activité se situant entre 0,04 mg chez NB7 et 0,398 mg chez Nistari ; en général, les races polyvoltines tropicales présentent une activité plus forte que les "races bivoltines" à haut rendement.

La lecture des données concernant les caractères du cocon et la durée larvaire (voir tableau I) rapprochée de l'activité enzymatique présentée dans la Fig. 1a montre clairement que la gamme de l'activité enzymatique dans l'hémolymphe ne peut pas être subdivisée sur la base des groupes à faible ou haut rendement ; par exemple, NB7, souche à haut rendement, et Nistid, race à faible rendement, présentent des activités pratiquement identiques (respectivement 0,178 et 0,193). De même, Nistari et Kalimpong A (KA) se situent dans la même fourchette d'activité pour l'amylose (respectivement 0,234 et 0,238 mg) dans l'hémolymphe. Les données montrent en outre qu'une activité forte de l'amylose dans l'hémolymphe ne s'accompagne pas toujours d'une activité similaire dans le suc digestif et réciproquement. Par exemple, l'activité enzymatique élevée dans le suc digestif pour Nistari s'accompagne d'une activité modérée dans l'hémolymphe.

Bien que l'on n'ait observé aucune relation apparente entre l'activité enzymatique de l'hémolymphe et les paramètres du rendement, une telle relation existe pour l'activité enzymatique du suc digestif. La comparaison de l'activité présentée dans la Fig. 1b avec les caractères du rendement (Tableau I) indique clairement que les souches/races tropicales à faible rendement (Nistari, Sarupath, PCN et C' nichii) ont une forte activité enzymatique tandis que cette activité est beaucoup plus faible pour les souches polyvoltines tropicales à haut rendement donnant des oeufs hibernants. L'activité amylose dans le sang et dans le suc digestif diffère donc de manière significative quant à l'existence d'une relation éventuelle avec l'indice de rendement. Ces observations ont conduit les auteurs à approfondir l'étude de la variabilité de l'activité de l'amylose dans le suc digestif et de sa signification éventuelle dans le potentiel de rendement des différentes souches de vers à soie polyvoltins.

Analyse de l'activité de l'amylase digestive chez les diverses races/souches géographique :

Les résultats de l'estimation de l'activité de l'amylase chez un grand nombre de souches/races du ver à soie *Bombyx mori* sont présentés dans la Fig. 2. L'évaluation a été faite à des moments déterminés, c'est-à-dire à la suite du 10^e ou du 15^e nourrissage au cinquième âge (3 nourrissons/jour), suivant deux modèles expérimentaux. L'estimation de l'activité enzymatique s'accompagne d'une estimation des paramètres du rendement, selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes. Les données présentées dans la Fig. 2 corroborent les observations faites dans d'autres études (Tableau I) et confirment l'association d'une activité forte de l'amylase pour les souches du groupe "œufs non hibernants". Cependant, pour comprendre cet aspect, les souches/races placées dans les groupes "hibernants/non hibernants" ont ensuite été classées suivant leur origine géographique (Tableau II) qui comprend également l'estimation des quatre composants du rendement analysés.

Les données présentées dans le tableau II montrent clairement que les souches et races indiennes traditionnelles non hibernantes ont une activité amylase plus élevée dans le suc digestif pour les premiers et derniers âges que les souches indiennes nouvellement isolées. Les souches hibernantes ayant un potentiel de rendement plus élevé et provenant du Japon, d'Europe et d'autres pays présentent des indices d'activité de l'amylase beaucoup plus faibles que les autres races.

L'évaluation des paramètres du rendement montre que les races/souches traditionnelles indiennes (non hibernantes) ont les valeurs les plus faibles pour le poids larvaire et le poids de la coque mais des valeurs supérieures à celles des autres races pour le taux effectif d'élevage. Les races japonaises et européennes ont des activités amylase pratiquement similaires à celles des souches bivoltines indiennes isolées.

Afin de détecter une relation entre les activités amylase et les autres paramètres dans le suc digestif chez les larves du début ou de la fin du 5^e âge, une analyse de corrélation a été réalisée. Les résultats (Tableau III) font clairement apparaître une corrélation positive forte entre l'amylase digestive et la survie ; la corrélation étant très forte pour l'activité amylase au 15^e nourrissage ($r = + 0,806$). Par ailleurs, les quatre autres paramètres, y compris la durée larvaire, donnent une corrélation négative forte avec l'activité de l'amylase digestive.

DISCUSSION

Les données présentées dans cette étude confirment une fois encore la présence d'une variabilité élevée de l'expression de l'amylase dans l'hémolymph de *Bombyx mori*. On ne peut pas expliquer la signification de cette variabilité observée pour l'activité amylase dans l'hémolymph. Néanmoins, nos résultats montrent clairement que l'activité enzymatique dans l'hémolymph n'a aucune relation apparente avec les caractères du cocon ou la survie des vers à soie.

L'activité de diverses "hydrolases" et "oxydoréductases" a été démontrée chez divers groupes d'insectes (Rockstein, 1974) mais les travaux antérieurs (Tanaka et Kushano, 1980) n'ont pas pu expliquer la véritable fonction de l'amylase dans l'hémolymph. Wyatt (1967) a suggéré que l'amylase dans l'hémolymph de l'insecte contribue probablement à la dégradation du glycogène dans l'hémolymph. Cependant, on ne dispose, à ce jour, d'aucune information sur une relation éventuelle entre l'activité de l'amylase et le métabolisme du glycogène.

Pour ce qui est de la relation entre le niveau d'activité de l'amylase dans l'hémolymph et dans le suc digestif, les données présentées ici suggèrent qu'elles sont indépendantes l'une de l'autre. Ceci corrobore également de manière générale l'hypothèse émise par Matsumura et ses collaborateurs (Yokoyama, 1959).

Matsumura et ses collaborateurs (Yokoyama, 1959) ont démontré qu'une activité enzymatique élevée dans l'hémolymph s'accompagne d'une activité enzymatique soit faible, soit élevée dans le suc digestif et inversement. Cependant, ils ont également affirmé que les souches polyvoltines tropicales ont une activité élevée aussi bien dans l'hémolymph que dans les sucs digestifs. Les données présentées ici contredisent cette affirmation car on a observé des activités amylase fortes et faibles dans l'hémolymph chez différentes souches polyvoltines tropicales d'Inde (Fig. 1 et 2).

Matsumura et d'autres ont présenté l'activité de l'amylase comme "faible" ou "élevée". Cependant, des travaux réalisés plus tard par Gamo (1983) ont montré que l'activité enzymatique peut également se situer dans des valeurs intermédiaires. D'après Moon et Seol (1983) et Hara et coll.

(1986), l'activité enzymatique de l'amylase dans le suc digestif peut être répartie en plusieurs groupes. En établissant une comparaison avec les travaux des chercheurs japonais, Moon et Seol (1983) ont classé les activités enzymatiques en six groupes pouvant être subdivisés en trois, selon des indices d'activité enzymatique de 0 à 10, de 16 à 48 et de 95 à 100. De même, Hara et coll. (1986) ont également montré qu'il était possible de classer les activités de l'amylase digestive en quatre groupes : activité très élevée : 20000 à 26000, activité élevée : 1200, activité moyenne : 4000 à 8000 et activité très faible : 10 à 15 mg/ml. Les données présentées ici montrent clairement qu'il n'est pas possible de diviser la plage de variation en groupes discontinus et que la variabilité est plutôt de nature continue, comme on l'a observé pour n'importe quel autre caractère quantitatif. L'étude de l'héritabilité par analyse de croisements de retour (Chatterjee et coll., non publié) fait également apparaître un modèle de ségrégation pour l'amylase similaire à celui obtenu pour des caractères comme "poids du cocon", "poids de la coque" ou "poids larvaire". Il est également intéressant de noter que le gène de l'amylase digestive a été cartographié sur le groupe de liaison 8:2,8. Cependant, la carte de linkage mise à jour par le laboratoire de Doira (non publiée) montre que l'amylase du système digestif est également liée au n° 18 bien que sa position exacte ne soit pas indiquée. Toutes ces observations démontrent la nécessité de poursuivre l'analyse biométrique afin d'évaluer le nombre minimal de loci de gènes impliqués dans l'activité de l'amylase digestive.

L'association apparente de l'activité amylase dans le suc digestif avec les caractères du cocon a suscité un bon nombre d'études sur la variabilité génétique (Hirata, 1974 ; Kanekatsu, 1973, 1978 ; Hara et coll., 1984, 1986). Hirata (1974) a analysé la relation entre l'activité de l'amylase dans le suc digestif larvaire et plusieurs caractères quantitatifs chez des souches bivoltines ayant des activités amylase digestive faibles et élevées. Ses résultats font apparaître une augmentation du poids du cocon, du poids de la coque, de la richesse soyeuse, de la production de coque par jour au 5^e âge et du taux de survie pour les larves ayant une activité amylase élevée. De plus, la différence est plus significative lorsque les larves sont nourries avec des feuilles durcies ou du milieu artificiel.

Moon et Seol (1983) ont également analysé l'effet de l'activité de l'amylase chez 11 souches sur les caractères du cocon et tenté d'étudier l'effet du pré-traitement des larves avec 0,1 % d' α -amylase sur leur développement. Leur étude indique que le poids larvaire diminue lorsque la concentration en amylase dans la nourriture augmente.

Nous avons étudié des races/souches géographiques ayant des caractères du cocon variables. Aucune analyse de corrélation sur un aussi grand nombre de souches n'avait encore été réalisée. Les études d'Hirata (1974) et d'autres chercheurs portaient principalement sur des souches bivoltines japonaises et chinoises, alors que notre étude comprend aussi bien des souches monovoltines, bivoltines que polyvoltines d'origine chinoise, japonaise et européenne.

Les souches polyvoltines indigènes sont bien connues pour leur adaptabilité supérieure aux conditions tropicales et à la faible qualité nutritive des variétés de mûriers indiennes traditionnelles. Les résultats présentés ici suggèrent que l'amylase digestive joue un rôle positif dans la robustesse, comme on l'observe généralement chez ces souches. Cependant, il n'est pas possible de déterminer par avance les voies directes ou indirectes de la contribution de l'amylase digestive. On peut seulement suggérer l'importance du métabolisme des hydrates de carbone chez le ver à soie dans la robustesse.

Horie (1961) a montré la présence de plusieurs activités liées aux hydrates de carbone dans les tissus de l'intestin moyen mais a observé que seule l'amylase était très active dans le suc digestif ; cependant, il n'a pas tenté d'expliquer l'association observée entre l'activité de l'amylase digestive et les paramètres du rendement. Pour ce qui est de la nature de l'enzyme, Kanekatsu (1978) a montré que l'enzyme est positivement analogue à l' α -amylase issue d'autres animaux.

L'étude présentée ici démontre la nécessité d'analyser d'autres enzymes dans le suc digestif ainsi que leur relation éventuelle avec les paramètres du rendement chez le ver à soie. Il est également évident qu'une étude approfondie sur le métabolisme des sucres chez le ver à soie pourrait permettre de comprendre la contribution de l'amylase à la survie et à l'augmentation de la vitesse de développement (Tableau II). En résumé, les résultats présentés dans cette étude indiquent qu'il est possible d'utiliser l'amylase digestive comme marqueur lors de la sélection pour l'amélioration de la survie des souches commerciales à haut rendement.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	693
General sericulture	
Mûrier	697
Mulberry	
<i>B. mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	703
<i>B. mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	707
Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	711
Silkworms : genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	713
Silkworms : physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	717
Silkworms : eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	719
Silkworms : silk glands	
Soie	721
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portuguais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</i> .	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the summary.

Sériciculture générale

General sericulture

Moriculture in coconut gardens - Potential and prospects.

Moriculture dans les plantations de cocotiers - Potentiel et perspectives.

ANIL KUMAR A.S.

Sivanivas, Kattachalkuzhy (P.O.), Trivandrum 695 509. India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(7), 13-14. (E)

Scope of improving labour efficiency in sericulture.

Possibilité d'améliorer le rendement en sériciculture.

BENCHAMIN K.V.

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(8), 20-24 (E)

Sericulture for rural development.

La sériciculture comme moyen de développement rural.

CARDENAS O.P.

Isabela State Univ., Cabagan, Isabella College of Forestry, Philippines.

1989 Journal of Research, Philippines, Vol. 5(1/2), 1-7. (E)

Plano para exploração sericícola. / Scheme for silkworm rearing.

Schéma d'une exploitation séricicole.

DA CUNHA E.A., OKAMOTO F., CANTO FONSECA T., DE ALMEIDA J.E.

Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura, Instituto de Zootecnia, Sao Paulo Brasil.

1991 Zootecnia, Nova Odessa SP., Vol. 29, 1-8. (P,e)

Study of mulberry - silkworm and silk production models and proposition of means for development.

Etude des modèles mûrier-ver à soie et production de soie et proposition de moyens de développement.

DANG DINH DAN.

Trung Tam Nghien Cuu Dau Tam To Trung Uong. Hanoi, Vietnam.

1991 Nong Nghiep va Cong Nghiep Thuc Pham, 8, 378-381. (V)

Russian-Ukrainian-English sericultural dictionary.

Dictionnaire séricicole Russe-Ukrainien-Anglais.

GOLOVKO V.A., ZLOTIN A.Z., MOHAN MURARI JHA.

Ukrainian Sericultural Research Institute, Merefa, Kharkov Region 312060, Ukraine.

1992 Ukrainian Sericultural Research Institute, Kharkov, 78 p. (R,U,E.)

Biotechnology in sericulture.

Biotechnologie en sériciculture.

GOPINATHAN K.P.

Dept. Microbiol. & Cell Biol., Center Genet. Engin., Indian Institute Sci., Bangalore 560012, India.

1992 Current Science, Vol. 62(3), 283-287. (E)

Biodigestion of silkworm litter for biogas production.

Biodigestion de la litière des vers à soie pour la production de gaz.

KALIMUTHU K., RAJASEKARAN P.

Department of Agro Energy, Tamil nadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, India.

1992 Indian J. Seric., Vol. 31(1), 17-22. (E,f)

Sericultural farming in the coming decade.

L'exploitation séricicole dans les dix années à venir.

KAWAKAMI K.

National Institute of Sericultural & Entomological Science, Tsukuba Ibaraki, Japan.

1992 Farming Japan, Vol. 26(5), 10-13. (E)

Insect pests of mulberry in Kashmir : concepts of integrated pest management and their control.

Insectes parasites du mûrier au Cachemire : principes d'une lutte intégrée.

KHAN M.A.

S.K. University of Agricultural Sciences & Technology, Shalimar Campus, Srinagar 190 001, India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(7), 36-37. (E)

Special features of tropical sericulture and five crucial steps to successful silkworm rearing.

Caractéristiques spéciales de la sériciculture tropicale et les cinq étapes cruciales pour réussir un élevage de vers à soie.

KRISHNASWAMI S.

Sericultural Research Institute, Central Silk Board, 39, M.G Road, Bangalore 560 001, India.

1993 Indian Silk, Vol.31(9), 27-34.(E)

Sericultural technology.

Technologie séricicole.

KURIBAYASHI S.

Silkworm Rearing, Dept. of Sericulture, National Inst. of Sericultural & Entomological Sci., Japan.

1992 Farming Japan, Vol. 26(5), 18-24. (E)

Advance of Korean sericulture to the foreign countries and its prospects.

Avancée de la sériciculture coréenne dans les pays étrangers et ses perspectives.

LEE S.P.

Rural Development Administration, Suwon, Sericulture Experiment Station, Korea Republic.

1989 Journal of the Korean Society of International Agriculture, Vol. 1(1), 111-122. (Ko,e)

New direction of Japan's sericultural industry.

Nouvelle direction de l'industrie séricicole au Japon.

MURAKAMI T.

Department of Sericulture, National Institute of Sericultural & Entomological Science, Japan.

1992 Farmin Japan, Vol. 26(5), 14-17. (E)

Improvement of production structure of sericultural farming-Analysis of results from surveys on cocoon production cost.

Amélioration de la structure de production séricicole-Analyse des résultats d'une étude sur le coût de production des cocons.

NOHMI M., SATOH T., KITAGAWA T., TANAKA H.

1992 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 61(3), 241-246. (J,e)

Differences of productivity and profits in sericultural farms and related factors. Analysis of cost surveys on cocoon production.

Etude sur les différences de productivité et de bénéfices dans les fermes séricicoles et les facteurs qui y sont liés. Analyse des estimations de coût de la production de cocons.

NOHMI M., SATOH T., KITAGAWA T., TANAKA H.

Faculty of Agriculture, Tottori University, Koyama-cho, Tottori 680, Japan.

1992 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 61(5), 393-399. (J,e)

Criação do bicho-da seda. / Silkworm rearings.

Elevages des vers à soie.

OKAMOTO F., DA CUNHA E.A., CANTO FONSECA T., DE ALMEIDA J.E.

Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericultura, Instituto de Zootecnia, São Paulo, Brazil.

1991 Zootecnia, Nova Odessa, SP., Vol. 29, 21-30. (P,e)

Levantamento da situação da sericultura paulista/Recovery of the sericulture in São Paulo, Brazil.

Redressement de la sériciculture dans la région de São Paulo, Brésil.

OKAWA H., JULIATTO TINOCO S.T.

CECOR SAA/CATI av. Brazil 2.340, Caixa Postal 960, CEP 13073 Campinas, São Paulo, Brazil.

1991 Doc. Técnico CATI, N 88, 1-103. (B)

Control of bird menace in sericulture.

Lutte contre la menace des oiseaux en sériciculture.

PAI I.K.

Department of Zoology, Goa University, P.O. Bambolim, Goa 403 202, India.

1993 Indian Silk, Vol. 31(9), 24-25. (E)

Deforestation : a threat to tasar culture.

Le déboisement : une menace pour la culture tasar.

SAHAY A., KAPILA M. L.

1992 Indian Silk, Vol. 31(7), 48-50. (E)

Recent development of South China's sericultural science and technology.

Récents développements de la science et de la technologie séricicole en Chine du sud.

SHIXIAN L., LIANZHANG X.

Guangdong Academy of Agricultural Sciences, South China.

1992 Indian Silk, Vol. 38(1), 29. (E)

Perspective of biological control in tasar culture.

Perspective du contrôle biologique de la culture tasar.

SINGH R.N., BAJPAYEE C.M., JAYASWAL J., THANGAVELU K.

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi (Bihar), India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(7), 46-47. (E)

Sericulture activities in Himachal Pradesh.

Activités séricicoles dans l'Himachal Pradesh.

SUNIL KUMAR GUPTA, SHAMSHER SINGH RANA.

Department of Commerce, Himachal Pradesh University, Shimla, India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(8), 41-42. (E)

Utility of sericultural wastes and byproducts in agriculture.

Utilisation des déchets et des sous-produits de la sériciculture en agriculture.

SURYAKANT MISHRA C., DASH M.C.

Dept. of Zoology, Orissa University of Agriculture & Technology, Bhubaneswar 751 003, India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(7), 38-40. (E)

Cocoons and silk producing technique.

Technique de production de cocons et de soie.

TAKABAYASHI C.

Filature Engineering Lab., National Institute of Sericultural & Entomological Science, Japan.

1992 Farming Japan, Vol. 26(5), 25-32. (E)

Silk handicrafts : source of lucrative earning.

Objets artisanaux en soie : une source de revenu lucratif.

UMA H.P., GOWRAMMA V., BAJPAI A.K., SINHA A.K.

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(8), 34-38. (E)

Processes of silkworm germplasm resource research in China.

Les banques génétiques de vers à soie en Chine.

WENZHONG Y., JIAN Q.

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu, Institute of Sericulture, China.

1991 Scientia Agricultura Sinica, Vol. 24(4), 47-51. (C,e)

Four decades of muga silk industry - An analytical review.

Quatre décades d'industrie de la soie muga. Revue analytique.

YADAV G.S., GOSWAMI B.C.

National Sericulture Project, Jagdalpur 494 001, (M.P.), India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(8), 46-50. (E)

Mûrier

Mulberry

A new report on the occurrence of *Chaetothyrium* and *Curvularia* fungi on mulberry.

Nouveau rapport sur la présence de champignons *Chaetothyrium* et *Curvularia* chez le mûrier.

ANANDA RAO A., CHAUHAN S.S., CHAKRABORTI S., SUBBA RAO G.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.

1992 Indian J. Seric., Vol. 31(1) 71. (E)

Clonal differences in mulberry (*Morus spp.*) for root growth parameters.

Les différences clonales chez le mûrier (*Morus spp.*) pour les paramètres de croissance de la racine.

BHAT G.G., HITTALMANI S.

Dept. Sericulture, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K. Campus, Bangalore 560 065, India.

1992 Indian J. Seric., Vol. 31(1), 5-8. (E,f)

Some field observations on the severity of powdery mildew (*Phyllactinia corylea*) in mulberry.

Quelques observations de terrain sur l'importance du mildiou (*Phyllactinia corylea*) chez le mûrier.

BISWAS S., TEOTIA R.S., MANDAL S.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742101, India.

1992 Indian J. Seric., Vol. 31(1), 67-69. (E)

Fertility evaluation and fertilizer recommendations for mulberry garden soils.

Evaluation de la fertilité et conseils pour l'utilisation d'engrais dans les muraies.

BONGALE U.D.

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

1993 Indian Silk, Vol. 31 (9), 5-8. (E)

Crop residues - A promising complementary resource to chemical fertilizer for mulberry production.

Déchets agricoles - un complément aux engrais chimiques pour la production de mûriers.

BOSE P.C., MUKHERJEE P.

Central Seric. Research & Training Insitute, 29 B/B Gandhinagar, Extension II, Jammu 180 004, India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(8), 32-33. (E)

Effect of mixed cropping of mulberry and vegetables on production of mulberry leaves.
Pengaruh penanaman tumpangsari murbei dengan sayuran terhadap produksi daun murei.

Effet de la culture mixte de mûrier et de légumes sur la production de feuilles de mûrier.

BUDISANTOSO S.H., ANWAR A., SAMPE B.

Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan, Bogor, Java, Indonesia.

1991 *Bulletin Penelitian Hutan*, 541, 33-38. (In,e)

Studies in mulberry tissue culture and genetic engineering - A mini review.

Etudes sur la culture des tissus et le génie génétique chez le mûrier.

CHAKRABORTI S.P., NARAYAN P., SENGUPTA K.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 1-4. (E)

Le mûrier et ses utilisations en France. Evaluation des potentialités des principales variétés introduites sur le territoire national.

The mulberry and its applications in France. Evaluation of the potentialities of the main varieties introduced on the national territory.

DE RAFELIS SAINT SAUVEUR A.

Conservatoire Botanique National de Porquerolles, Castel Ste Claire, 83400 Hyeres, France.

1990 *Thèse. Conservatoire Botanique National de Porquerolles*, 68 p. (F)

Transformation of paper mulberry plants (*Broussonetia kazinoki* Sieb.) by infection with *Agrobacterium tumefaciens*.

Transformation des plants de mûrier papier (*Broussonetia kazinoki* Sieb.) par infection avec *Agrobacterium tumefaciens*.

ENOMOTO S., ITOH H., OHSHIMA M., OKA S., OHASHI O.

National Institute of Agrobiological Resources, Ibaraki, Tsukuba 305, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 201-206. (J,e)

Prevalence of viral diseases in mulberry.

Prédominance des maladies virales chez le mûrier.

GUPTA V.P., GOVINDAIAH, BAJPAI A.K.

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

1992 *Indian Silk*, Vol.31(7), 34-35. (E)

Nursery technique for raising asan seedling.

Culture en pépinière de jeunes plants asan.

ISA Md., THANGAVELU K.

Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(8), 30-31. (E)

A simulation study on characteristics of CO₂ assimilation in mulberry fields with different row orientations.

Simulation des caractéristiques de l'assimilation du CO₂ dans les mûraies avec des alignements différents.

ITO D.

National Institute of Sericultural & Entomological Science, Tsukuba Ibaraki 305, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 193-200. (J,e)

Varietal difference in leaf quality of mulberry (*Morus spp.*) plants harvested in July and October.

Difference variétale de la qualité des feuilles de mûriers récoltées en juillet et en octobre.

IWANARI Y., SHIMADA J.

Tokyo University of Agriculture and Technology, Faculty of Agriculture, Japan.

1989 Bulletin of the Farms - Tokyo University of Agriculture and Technology, 13, 1-6. (J)

Effects of foliage spray on the quality of mulberry leaves in October.

Effets de la brumisation du feuillage sur la qualité des feuilles de mûrier en octobre.

IWANARI Y., SHIMADA J., SUZUKI H., OKITU K., MARU T., NAKAYAMA F.

Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Fac. of Agriculture, Japan.

1989 Bulletin of the Farms - Tokyo Univ. of Agric. & Technology, 13, 7-15. (J)

Salt-exclusion techniques for efficient mulberry cultivation in the soils of Sunderban area of West Bengal.

Techniques de désalinisation des sols de la région de Sunderban au Bengal occidental pour améliorer la culture du mûrier.

MAJUMDER S.K., RANJIT KAR, RABINDRA NATH DUTTA.

Dept. of Soil Sc. & Chem., Ctrl. Seric. Research & Training Inst., Berhampore 742 101, W. B., India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(8), 27-28. (E)

Induced mutation in mulberry using gamma radiation.

Mutation induite chez le mûrier à l'aide des rayons gamma.

MEESILPA P., PHADVIBULYA V.

Sisaket Sericultural Research Centre, Thailand.

1990 Proceedings Series FAO/IAEA Symposium on the contribution Plant Mutation, 513-517. (E)

Mulberry variety with high-yield and good leaf quality "Shin-gwangppong" and "Cheong-unppong".

Variétés de mûriers ayant un rendement élevé et donnant des feuilles de bonne qualité: "Shin-gwangppong" et "Cheong-unppong".

PARK K.J., CHO C.H., NAM H.W., KIM H.R., YANG S.Y., LEE S.U.

Rural Development Administration, Suwon, Sericultural Experiment Station, Korea Republic.

1991 The Research Reports of the Rural Development Administration, Vol. 33(3), 50-63. (Ko,e)

Effect of environmental factors on mulberry diseases.

Effet des facteurs d'environnement sur les maladies des mûriers.

PHILIP T.

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

1992 Indian Silk, Vol. 31(7), 10-12. (E)

Influence of phyto-mulches on soil temperature, moisture conservation, growth and leaf yield of rainfed mulberry during winter in west bengal.

L'effet des composts sur la température du sol, la conservation d'humidité, la croissance et le rendement foliaires du mûrier non irrigué en hiver au Bengal occidental.

PUROHIT K.M., RAY D., SUBBA RAO G.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, W.B., India.

1992 Indian J. Seric., Vol. 31(1), 41-47. (E,f)

Effect of foliar spray of urea on the mulberry leaf yield and its nutritive quality.

Effet d'une vaporisation foliaire d'urée sur le rendement et la qualité des feuilles de mûrier.

QAIYYUM M.A., QUADER M.A., BARI M.A.

Bangladesh Sericulture Research and Training Inst., Rajshahi, Bangladesh.

1991 Pakistan Journal of Agricultural Research, Vol. 12(3), 188-192. (E)

Comparative study of leaf protein from different mulberry varieties.

Etude comparative des protéines des feuilles de différentes variétés de mûriers.

QUADER M.A., BARI M.A.

Bangladesh Sericulture Research & Training Institute, Rajshahi, Bangladesh.

1989 Bangladesh Journal of Agriculture, Vol. 14(1), 85-88. (E)

Nutritional quality of mulberry leaves raised under different forms of cultivation.

Qualité nutritionnelle des feuilles de mûrier en fonction des différentes formes de culture.

QUADER M.A., SARKER A.A., AHMED S.U.

Bangladesh Sericulture Research & Training Institute, Rajshahi, Bangladesh.

1989 Bangladesh Journal of Agriculture, Vol. 14(1), 45-50. (E)

Occurrence of root-knot nematode in mulberry and its management.

Maladie du nématode de la racine chez le mûrier et son traitement.

SARKAR J., SARKAR S., BANERJEE K.

Regional Sericultural Research Station, Mothabari, Malda, (W.B.), India.

1993 Indian Silk, Vol. 31(9), 45-46. (E)

Effects of types and duration of storage on moisture content of mulberry (*Morus* spp.) leaves.

Effets des types et de la durée de stockage sur le contenu en eau des feuilles de mûrier *Morus* spp.

SARKER A.A., QUADER M.A., AHMED S.U.

Bangladesh Sericulture Research and Training Inst., Rajshahi, Bangladesh.

1989 Bangladesh Journal of Agriculture, Vol. 14(1), 37-44. (E)

Effect of different types of feeding on castor and cassava leaves for rearing of eri-silkworm *Samia cynthia ricini* (Boisd) in Bangladesh.

Effet de différents types de nourrissage avec des feuilles de ricin et de manioc sur l'élevage du ver à soie eri *Samia cynthia ricini* (Boisd) au Bangladesh.

SHAHJAHAN M., HOSSAIN M.A., HOSSAIN M.

1990 Bangladesh Journal of Crop Science, Vol. 1(1), 45-52. (E)

Morphological characters of regenerated mulberry trees from preserved winter buds in liquid nitrogen.

Caractères morphologiques des mûriers régénérés à partir de bourgeons d'hiver conservés dans de l'azote liquide.

SHIRATA K., SATO K., YAKUWA H., OKA S.

1992 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 61(5), 463-465. (J)

Laboratory evaluation of insecticides against the white grub, *Anomala blanchardi* Blanch. a pest of tasar food plant.

Evaluation en laboratoire d'insecticides contre le ver blanc, *Anomala blanchardi* Blanch., un parasite de la plante nourricière du tasar.

SINGH R.N., MANDAL K.C., KUMAR N., SINHA S.S.

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 834 005, India.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 65-66. (E)

Micronutrients and their role in mulberry nutrition.

Rôle des micronutriments dans l'alimentation du mûrier.

SINHA A.K., SUBBASWAMY M.R., MUNIRATHNAM REDDY M., DATTA R.K.

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

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(7), 43-45. (E)

Technique to minimize the process of defoliation in oak tasar.

Technique pour minimiser le processus de défoliation par le tasar du chêne.

SINHA P.S., SINGH B.D., SINHA S.S.

Regional Sericultural Research Station, Ranchi, Bihar, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(8), 39-40. (E)

Studies on the variations in chemical constituents in relation to maturity of leaves in three primary food plants of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.

Etudes sur les variations des constituants chimiques en fonction de la maturité des feuilles dans trois plantes nourricières primaires du ver à soie tasar tropical *Antheraea mylitta* D.

SINHA U.S.P., SINHA A.K., SRIVASTAVA P.P., BRAHMACHARI B.N.

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 835 005, India.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 83-86. (E)

Importance of calcium and magnesium nutrition in mulberry garden.

Importance de l'apport en calcium et en magnésium dans les mûraies.

SUBBARAYAPPA C.T., SINHA A.K., SUBBASWAMY M.R., REDDY M.M., DATTA R.K.

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(7), 32-33. (E)

Shoot-tip abscission of internodes in mulberry (*Morus alba*).

Abscission de l'extrémité des scions des entre-noeuds chez le mûrier *Morus alba*.

SUZUKI T.

Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Japan.

1991 *Physiologia Plantarum (Denmark)*, Vol. 82(4), 483-489. (E)

Apical control of lateral bud development and shoot growth in mulberry (*Morus alba*).

Contrôle apical du développement du bourgeon latéral et de la croissance du scion chez le mûrier *Morus alba*.

SUZUKI T.

Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Japan.

1990 *Physiologia Plantarum (Denmark)*, Vol. 80(3), 350-356. (E)

Dormancy and spring burst of lateral buds on stems of low-pruned mulberry (*Morus alba* L).
Dormance et débourrement printanier des bourgeons latéraux de mûrier (*Morus alba* L.) ayant subi une taille basse.

SUZUKI T., KITANO M., KOHNO K.

Kyoto Kogei Sen I University, Faculty of Textile Science, Japan.

1989 *Annales des Sciences Forestières, Elsevier Paris, Vol. 46, 233-235. (E)*

Studies on effect of "CAN" on growth and leaf yield of mulberry in acidic soil.

Les effets du CAN (nitrate de calcium-ammonium) sur la croissance et le rendement foliaire du mûrier dans un sol acide.

TEOTIA R.S., CHOUDHARY S.K., CHINYA P.K.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, India.

1992 *Indian Journal Seric., Vol. 31(1), 31-36. (E,f)*

Physiological influence of retained leaves on developmental growth phases of mulberry (*Morus* spp.)

Influence physiologique du maintien de feuilles sur la croissance du mûrier (*Morus* spp.)

TRIBHUWAN SINGH., KAMALA SINGH.

Silkworm Seed Technological Laboratory, Carmelram Post, Kodathi, Bangalore 35, India.

1992 *Indian Silk, Vol. 31(7), 21-22. (E)*

Biochemical changes in leaves of *Shorea robusta*, infected by leaf spot.

Modifications biochimiques des feuilles de *Shorea robusta* atteintes par la maladie de la tache.

UMESH KUMAR N.N.

Department of Sericulture, Bangalore University, P.K. Block, Bangalore 560 009, India.

1992 *Indian J. Seric., Vol. 31(1), 23-25. (E,f)*

Enzymatic changes in mulberry leaves infected by *Cerotelium fici*.

Modifications enzymatiques dans les feuilles de mûrier infectées par *Cerotelium fici*.

UMESH KUMAR N.N.

Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore 560 009, India.

1992 *Indian J. Seric., Vol. 31(1), 81-82. (E)*

B. mori : élevage, nutrition, pathologie.

B. mori : rearing, feeding, pathology

Effect of liming of the cocooning frame on cocoon production. Pengaruh pemberian kapur pada alat pengokonan terhadap produksi kokon.

Effet du traitement des encabanages à la chaux sur la production de cocons.

ANWAR A.

Pusat Penelitian dan Pengembangan, Hutan, Bogor, Java, Indonesia.

1991 *Bulletin Penelitian Hutan*, **541**, 1-6. (In,e)

Ph of silkworm artificial diet affects growth in subsequent rearing on fresh mulberry leaves.

Le pH de l'alimentation artificielle du ver à soie affecte la croissance de ce même élevage sur feuilles de mûriers fraîches.

CHEN R., ZHANG C., ICHIDA M., MORI H., SUMIDA M., KITANO M., MATSUBARA F.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 455-459. (J)

Geo-orientation and photo-orientation behavior of *Bombyx mori* at termination of cocoon construction.

Géotropisme et phototropisme chez *Bombyx mori* à la fin de la construction du cocon.

HORI S., SHIMIZU I.

Kyoto University, Faculty of Science, Japan.

1990 *Applied Entomology and Zoology*, Vol. 25(2), 177-186. (E)

Some popular mulberry silkworm races in India

Quelques races de vers à soie mûriers populaires en Inde.

JAYASWAL K.P, DATTA R.K

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

1993 *Indian Silk*, Vol.31(9), 50-52. (E)

Primary and secondary structures of 5S ribosomal RNA of *Nosema bombycis* (Nosematidae, Microsporidia).

Structures primaire et secondaire de l'ARN ribosomal 5S de *Nosema bombycis* (Nosematidae, Microsporidia).

KAWAKAMI Y., INOUE T., KIKUCHI M., TAKAYANAGI M., SUNAIRI M. *et al.*

College of Agric. & Veterinary Medicine, Nihon University, Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 321-327. (E)

Effect of feeding tukra affected mulberry leaves on silkworm rearing performance.

Effet de l'alimentation avec des feuilles de mûriers atteintes de tukra sur l'élevage de vers à soie.

KUMAR P., KISHORE R., NOAMANI M.K.R., SENGUPTA K.

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

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 27-29. (E,f)

Researching on humidity and temperature influence on the rate of spinning web of cocooning silk-worm. Nghiên cứu ảnh hưởng của ẩm độ và nhiệt độ không khí lúc tam lam ken den ty le len to.

Recherche sur l'influence de la température et de l'humidité sur le taux de filage du ver à soie.

LE THI KIM

Trung Tam Nghiên Cứu Dâu Tằm To Trung Uong, Hanoi, Vietnam.

1988 *Khoa Hoc va Ky Thuat Nong Nghiep*, 8, 376-377. (Vi,e)

Studies on the performance and adaptation of bivoltine races of silkworm, *Bombyx mori* L. of Kashmir and evaluation of heterosis in their hybrids under temperate and subtropical climates.

Etudes sur la performance et l'adaptation des races bivoltines de *Bombyx mori* L. du Cashemire et évaluation de l'hétérosis chez les hybrides sous climats tempéré et sub-tropical.

MANZOOR AHMED MALIK

University of Mysore, Sericultural Research Project, Manasagangotri, Mysore 570 006, India.

1992 *Thesis. University of Mysore, India*, 193 p. (E)

Study of lowering costs of an aseptic rearing system of young silkworms on an artificial diet.

Abaissment des coûts d'un élevage de jeunes vers à soie sur aliment artificiel en milieu aseptique.

MATSUBARA F., CHEN R.Y., SUMIDA M., MORI H., ICHIDA M., XI LIN YUAN.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-Ku, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

1991 *Bull. of the Apparel Science Research Center*, Vol. 10, 1-5. (J,e)

Production of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. utilizing culture media made with pupae of the silkworm *Bombyx mori* L. 1758.

Production de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson et *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en utilisant un milieu de culture à base de farine de chrysalides de ver à soie *Bombyx mori* L. 1758.

NEVES P.M.O.J.

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, Brazil.

1991 *Piracicaba, SP Brazil*, 152 p. (P)

On the characteristics of farm management and sericultural technic in the farm households using an automatic rearing machine for grown silkworm (Japan).

Caractéristiques de la gestion de la ferme et de la technique séricicole chez les fermiers utilisant une machine automatique d'élevage pour les vers à soie (Japon).

ONO N., IWANARI Y.

Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Fuchu, Fac. of Agriculture, Japan.

1989 *Bulletin of the Farms - Tokyo Univ. of Agriculture & Technology*, 13, 16-21. (J)

Mechanized separation of racial cocoons according to sex in connection with commercial production of eggs of silkworm (*Bombyx mori* L.).

Séparation mécanisée des cocons de *Bombyx mori* en fonction du sexe.

PETKOV N., MLADENOV G., TSENOV P.

Experimental Station of Sericulture, Vratsa, Bulgaria.

1992 *Animal Science*, Vol. 29(1/2), 80-85. (B,e)

Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Production d'anticorps dans des cellules du ver à soie et chez les larves infectées par un virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* doublement recombiné.

REIS U., BLUM B., VON SPECHT B.-U., DOMDEY H., COLLINS J.

Dept. Genetics, GBF, Gesellschaft für Biotech., Forschung mbH, D-W3300 Braunschweig, Germany.

1992 *Biotechnology*, Vol. 10, 910-912. (E)

A study of the effect of some widely used insecticides in the practice on silkworm (*Bombyx mori* L.) development.

Effet de quelques insecticides largement utilisés sur le développement de *Bombyx mori*.

REKOV D., NIKOLOV A., SENGALOVICH G.

Agrarian Institute, Plovdiv, Bulgaria.

1992 *Animal Science*, Vol. 29(1/4), 91-97. (B,e)

Impact of spacing in silkworm rearing.

Effet de l'espacement dans les élevages de vers à soie.

ROYCHOUDHURY N., BASU R., SHAMSUDDIN M.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(8), 25-26. (E)

Improvement of bivoltine rearing through enrichment of mulberry leaves.

Amélioration des élevages bivoltins par enrichissement des feuilles de mûriers.

ROYCHOUDHURY N., BASU R., SHAMSUDDIN M., SEN S.K., SINHA S.S.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(8), 10-11. (E)

Effects of soaking mulberry leaves in glucose solution on silkworm survival, cocoon and filament qualities, hatchability and fecundity of silkworm, *Bombyx mori*.

Effets du trempage des feuilles de mûrier dans une solution de glucose sur la survie, les qualités du cocon et du filament, l'éclosion et la fécondité du ver à soie *Bombyx mori*.

SAMSIJAH

1991 *Bulletin Penelitian Hutan (Indonesia)*, 535, 35-45. (In,e)

Comparative study of the natural and artificial diet of the silkworm (*Bombyx mori* Linn).

Etude comparative de l'alimentation artificielle et naturelle du ver à soie *Bombyx mori* L.

SANNAMVONG K., QUINIONES A.C.

Central Luzon State University, Institute of Graduate Studies, Munoz, Nueva Ecija, Philippines.

1990 *CLSU Scientific Journal*, Vol. 11(1), 27-38. (E)

Conseils pour la réalisation d'un milieu nutritif artificiel destiné à l'élevage de larves de Lepidoptères.

Advices for making an artificial diet for rearing lepidopteran larvae.

SEVERINI M.

1992 *Insectes*, 1992, 85, 23-24. (F)

Purification and properties of an extracellular protease from *Beauveria bassiana*.

Purification et propriétés d'une protéase extra-cellulaire de *Beauveria bassiana*.

SHIMIZU S., TSUCHITANI Y., MATSUMOTO T.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 421-428. (E)

Performance of four popular bivoltine breeds of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. in Koraput.

Performances de quatre souches bivoltines populaires de ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. à Koraput.

SINGH DEO S.N., SINGH T., DAS M.

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, PO Box 9, Koraput 764 020, Orissa, India

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 61-62. (E)

Effect of bleaching powder and lime against grasserie and muscardine diseases of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Effet de la poudre à blanchir et de la chaux contre la grasserie et la muscardine chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

SUBBA RAO G., CHANDRA A.K., BHATTACHARYA J.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore, 742 101, W.B. India.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 37-40. (E,f)

A method for continuous measurement of the temperature in a cocoon cooking machine.

Méthode de mesure continue de la température dans un étouffoir à cocons.

TAKABAYASHI C.

Div. Filature Tech., Matsumoto Branch, Inst. of Seric. & Entomol. Sci., Okaya City, Nagano 394, Japan

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 257-264. (J,e)

Administration of 20-OH-ecdysone to 5th instar larvae of parent silkworms for hybridization reared on an artificial diet ; effects on spinning, cocooning and egg production.

Administration de 20-OH-ecdysone à des larves du 5ème stade de vers à soie élevées sur aliment artificiel ; effets sur le filage, le coconage et la production d'œufs.

TAKIZAWA H., MITSUMASA S.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 341-346. (J,e)

A-25 : A new multivoltine genotype.

A-25 : Un nouveau génotype polyvoltin.

TRIBHUWAN SINGH, SUBBA RAO G.

Silkworm Seed Technology Laboratory, Camelram Post, Kodathi, Bangalore 560 035, India.

1993 *Indian Silk*, Vol. 31(9), 9-12. (E)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Genetic resource of tropical tasar silkworm - Its exploration and utilization.

Ressource génétique chez le ver à soie tasar. Son exploration et utilisation.

AJIT KUMAR SINHA, BAJPAI C.M, THANGAVELU K.

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi, India.

1993 *Indian Silk*, Vol.31(9), 47-49.(E),

Pebrine : Prevention and control measures in tasar culture.

Pébrine : mesures préventives et méthodes de lutte dans les cultures tasar.

BANSAL A.K., SHUKLA R.M., SAXENA N.N., THANGAVELU K.

Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi, Bihar.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(8), 5-9. (E)

Effect of castor leaves of different maturity on the rearing of eri-silworm, *Philosamia ricini* (Hutt.).

Effet des différences de maturité des feuilles de ricin sur l'élevage du ver à soie eri, *Philosamia ricini* (Hutt.).

HAQUE M.A., SHAHJAHAN M., HOSSAIN M.

Department of Entomology, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, Bangladesh.

1989 *Bangladesh Journal of Agriculture*, Vol. 14(2), 129-133. (E)

Rearing two generations of the wild silkmoth *Antheraea yamamai* throughout one year by artificial hatching with an imidazole compound.

Elevage de deux générations de papillons sauvages *Antheraea yamamai* sur une année par éclosion artificielle à l'aide d'un composé imidazole.

HASHIMOTO S., FUJISAWA T., KUWANO E., SUZUKI K.

Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Iwate University, Morioka 020, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 378-379. (J)

Identification of the sex pheromone of the mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera : Pyralidae).

Identification de la phéromone sexuelle de la pyrale du mûrier, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera : Pyralidae).

HONDA H., ANDO T., OGURA Y., TERAMINE T., UEDA R.

Tokyo University, Faculty of Agriculture, Japan.

1990 *Applied Entomology and Zoology*, Vol. 25(2), 265-272. (E)

Stabilized production of cocoon of Japanese wild silk moth, *Antheraea yamamai*, reared on artificial diet.

Production stabilisée de cocons du ver à soie sauvage Japonais *Antheraea yamamai* élevé sur aliment artificiel.

ICHIDA M., KITANO M.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

1991 *Bull. of the Apparel Science Research Center*, Vol. 10, 17-20. (J)

Evaluation of diets for larvae of the eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera : saturniidae).

L'évaluation des régimes alimentaires pour les larves du ver à soie eri *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera : saturniidae).

JOSHI K.L.

Experimental field station, Zoology Dept., University of Jodhpur, Jodhpur 342 001, India.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 49-51. (E,f)

Diapause strizin of muga silkworm - An alternative to boost up muga industry.

Souche diapausante du vers à soie Muga - Une alternative pour relancer l'industrie Muga.

KAKATI P.K

National Silkworm Seed Project, Sibsagar, Assam, India.

1993 *Indian Silk*, Vol.31(9), 22-23. (E)

A note on secondary food plants of eri silkworm.

Note sur les plantes alimentaires secondaires du ver à soie Eri.

KUMAR R., PRASAD D.N., SAHA L.M.

Central Eri Research and Training Institute, Mendipathar, India.

1993 *Indian Silk*, Vol.31(9), 20-21. (E)

Oak Tasar and its problems in the North East.

Le tasar du chêne et ses problèmes dans le nord-est.

NOAMANI K.R.

Regional Tasar Research Station, Imphai 795 002, Manipur, India.

1993 *Indian Silk*, Vol.31(9), 39-44. (E)

Comparative study of haemocytes of three lepidopterans by light and scanning electron microscopy.

Etude comparative des hémocytes de trois lépidoptères par microscopie optique et électronique à balayage.

SAXENA B. P.

1992 *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, Vol. 89(5), 323-330. (Cz,e)

Rearing of eri silkworm, *Philosamia cynthia ricini*, on artificial diet.

Elevage du ver à soie eri *Philosamia cynthia ricini* sur aliment artificiel.

SHIMIZU O., AKAI H.

Gunma Sericultural Experiment Station, Soja, Maebashi 371, Japan.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 53-57. (E,f)

Integrated management of erratic emergence in temperate tasar *Antheraea proylei* J.
Gestion intégrée de l'émergence irrégulière du papillon tasar tempéré *Antheraea proylei* J.
SINHA P.S., SINHA S.S.
Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore, India.
1992 Indian Silk, Vol. 31(7), 15-20. (E)

Histopathological investigation on the replication of two nuclear polyhedrosis viruses of *Antheraea yamamai* and *Spodoptera litura* in larvae of *Antheraea yamamai*, *Antheraea pernyi* and *Spodoptera litura*.
Recherche histopathologique sur la réplication de deux virus de la polyédrose nucléaire d'*Antheraea yamamai* et de *Spodoptera litura* chez les larves d'*Antheraea yamamai*, *Antheraea pernyi* et *Spodoptera litura*.
YU QING LIN, IWASHITA Y.
Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Utsunomiya, Tochigi 321, Japan.
1992 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 61(4), 295-299. (J,e)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Application du transfert de gène inter-espèces à l'étude de la régulation des gènes de *Bombyx* codant pour les protéines de la soie.

Application of the inter-species gene transfer to the study of the *Bombyx mori* genes coding for silk proteins.

BELLO B.

Université Cl. Bernard Lyon I., 43 bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, France.

1992 *Thèse. Univ. Cl. Bernard Lyon I.*, 90 p. (F)

Genetical studies on the japanese translucent mutant of *Bombyx mori*.

Etudes génétiques sur le mutant translucide japonais de *Bombyx mori*.

DOIRA H., KIHARA H., KAWAGUCHI Y.

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 451-454. (J,e)

Gene structure of *Bombyx mori* larval serum protein (BmLSP).

Structure du gène de la protéine de sérum larvaire (BmLSP) de *Bombyx mori*.

FUJIWARA Y., YAMASHITA O.

Laboratory of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya, Japan.

1992 *Insect Molecular Biology*, Vol. 1(2), 63-69. (E)

Two distinct genes encode two major isoelectric forms of insecticyanin in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Deux gènes distincts codant deux formes isoélectriques majeures d'insecticyanine chez le ver du tabac *Manduca sexta*.

LI W., RIDDIFORD L.

Department of Zoology, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA.

1992 *Eur. J. Biochem.*, Vol. 205, 491-499. (E)

Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range.

Expression d'un gène étranger par un baculovirus ayant un large éventail d'hôtes.

MORI H., NAKAZAWA H., SHIRAI N., SHIBATA N., SUMIDA M., MATSUBARA F.

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-Ku, Kyoto 606, Japan.

1992 *Journal of General Virology*, Vol. 73, 1877-1880. (E)

Combinational ability in inbred lines of the mulberry silkworm.

Capacité combinatoire des lignées inbred du ver à soie du mûrier.

NASRIDINOVA S., STRUNNIKOV V. A.

Academy of Sciences of the USSR, Moscow.

1991 *Doklady : Biological Sciences - Akademia nauk SSSR*, Vol. 318(1/6), 295-297. (E,r)

An ecdysteroid-inducible *Manduca* gene similar to the drosophila DHR3 gene, a member of the steroid hormone receptor superfamily.

Un gène inductible par les ecdystéroïdes chez *Manduca* semblable au gène DHR3 de la drosophile, un membre de la super-famille des récepteurs d'hormones stéroïdes.

PALLI S.R., HIRUMA K., RIDDIFORD L.M.

Department of Zoology, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA.

1992 *Developmental Biology*, Vol. 150, 306-318. (E)

Estimates of reciprocal effects for quantitative traits in silkworm, *Bombyx mori* L.

Evaluation des effets réciproques pour les caractères quantitatifs chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

SATENAHALLI S.B., GOVINDAN R., GOUD J.V.

Dept. of Seric. College of Agriculture, University of Agricultural Sciences, Dharwad 580 005, India.

1991 *The Mysore Journal of Agric. Sci.*, Vol. 25(1), 66-70. (E)

Homeotic transformation in ENk mutant cells is not affected by neighboring normal cells in genetic mosaics of the silkworm, *Bombyx mori*.

La transformation homéotique chez les cellules mutantes ENk n'est pas affectée par les cellules contigües normales dans les mosaïques génétiques du ver à soie *Bombyx mori*.

SHIMADA T., KOBAYASHI M.

Department of Agrobiolgy, Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 444-450. (E)

Studies on heterosis and combining ability in some multivoltine and bivoltine breed of the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur l'hétérosis et la capacité combinatoire dans certaines souches polyvoltine et bivoltine du ver à soie *Bombyx mori*.

VIJAYA RAGHAVAN K., DAS P.K.

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

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 77-80. (E)

Abnormal segregation of characters in the progeny hatched from giant eggs oviposited by a gynogenetic tetraploid moth mated with a normal male moth in *Bombyx mori*.

Ségrégation anormale de caractères chez les lignées provenant d'oeufs géants pondues par un papillon tétraploïde gynogénétique accouplé avec un papillon mâle normal *Bombyx mori*.

YOKOYAMA T., OSHIKI T.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture & Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 300-305. (J,e)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Yew and fern - Potential sources of silkworm moulting hormone, ecdysone.

Bois d'If et fougères, sources potentielles d'hormone de mue, l'ecdysone.

BOSE P.C., MAJUMDER S.K., BOSE G

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.

1992 Indian Silk, Vol. 31(8), 38. (E)

Comparison between haemagglutinational active matter in digestive juice and agglutinins in haemolymph in oak silkworms.

Comparaison entre la substance hémagglutinante du suc digestif et les agglutinines de l'hémolymph chez le ver à soie du chêne.

DING J., XU G., LI S.

Liaoning Provincial Institute of Sericulture, Fengcheng, China.

1991 Liaoning Agricultural Science, 3, 33-36. (C)

Insect juvenile hormone research Fundamental and applied approaches. Chemistry, biochemistry and mode of action.

Recherches sur l'hormone juvénile des insectes. Approches fondamentales et appliquées.

MAUCHAMP B., COUILLAUD F., BAEHR J.C.

Unité nationale séricicole INRA 25 quai J-J. Rousseau 69350 La Mulatière, France.

1992 INRA Editions, Paris, Science update, 296 p. (E)

Studies on the free amino acid contents in the haemolymph of silkworms reared on an artificial diet.

Etudes sur les contenus en acides aminés libres dans l'hémolymph des vers à soie élevés sur aliment artificiel.

MORI H., CHEN R., TAWARA H.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-Ku, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

1991 Bull. of the Apparel Science Research Center, Vol. 10, 6-16. (J,e)

Ecdysteroid secretion in the non-molting larvae of the nm-g mutant of the silkworm, *Bombyx mori*.

Sécrétion d'ecdystéroïdes chez les larves non-muantes du mutant nm-g du ver à soie *Bombyx mori*.

NAGATA M., TSUCHIDA K., ORIKASA C., SUZUKI A.

Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 400-406. (J,e)

Effetti della somministrazione di ecdisteroidi su larve "non filanti" di *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae)./ Effects of ecdysteroids administration on "non spinning larvae" of *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

Effet de l'administration d'ecdystéroïdes sur les larves "non filantes" de *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

SBRENNI G., LEI M., CAPPELLOZZA S., CAPPELLOZZA L.

Istit. Sperimentale Zool. Agraria, Sezione Specializzata Bachicoltura Via dei Colli 28, 35143 Padova, Italia.

1992 *Estratto da REDIA*, Vol. LXXV, N1, 189-202. (I,e)

Effets du gaz carbonique sur le rythme cardiaque du ver à soie en réponse à la variation de la température.

Carbon dioxide effects on cardiac response of the silkworm to temperature modification.

SILLANS D.

Laboratoire de Biométrie URA-CNRS 243, Univ. Cl. Bernard Lyon I, 43 Bd. du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne F.

1992 *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 315, Série III, 373-378. (E,f)

Studies on the orientation pattern of pupae in double cocoons of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Etudes sur l'orientation de la chrysalide dans les cocons double chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

SINGH T., SINGH DEO S.N., DAS M.

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, PO Box 9, Koraput 764 020, Orissa, India

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 59-60. (E)

Changes in the concentration of cholesterol in the larval and pupal haemolymph of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.

Variations de la concentration de cholestérol dans l'hémolymph larvaire et nymphale du ver à soie tropical tasar, *Antheraea mylitta* D.

SINHA U.S.P., SINHA A.K., GOEL R.K.

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi-834 005, India.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 73-75. (E)

Developmental expression and hormonal regulation of the nuclear 29kDa juvenile hormone-binding protein in *Manduca sexta* larval epidermis.

Expression au cours du développement et régulation hormonale de la protéine nucléaire 29kDa, une protéine fixant l'hormone juvénile dans l'épiderme larvaire de *Manduca sexta*.

SUBRA REDDY PALLI, McCLELLAND S., HIRUMA K., LATLI B., RIDDIFORD L. M.

Department of Zoology, Univ. of Washington, Seattle, Washington 98195, USA.

1991 *The Journal of Experimental Zoology*, Vol. 260, 337-344. (E)

Induction of antibacterial peptides in the haemolymph by injection of formalin-treated *Escherichia coli* K-12 in the silkworm, *Bombyx mori* aseptically reared on an artificial diet and its activity changes during larval-pupal-adult development.

Induction de peptides antibactériens dans l'hémolymph de *Bombyx mori* élevé en milieu aseptique sur aliment artificiel par injection d'*Escherichia coli* K-12 traitée au formol ; variations d'activité au cours du développement.

SUMIDA M., ICHIMORI H., MORI H., MATSUBARA F.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-Ku, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1991 *Bull. of the Apparel Science Research Center*, Vol. 10, 26-29. (E)

Isolation of cocoonase from the silkworm, *Bombyx mori*, by high performance liquid chromatography and catalytic specificity.

Isolement de la coconase chez le ver à soie, *Bombyx mori*, par chromatographie liquide à haute performance et étude de sa spécificité catalytique.

YAMAZAKI Y., OGAWA K., KANEKATSU R.U.

Laboratory of Biological Science, Katakura Kogyo co., Matsumoto 390, Japan.
1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 228-235. (J,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Ecdysteroids in developing eggs of *Antheraea mylitta* (Lepidoptera : Saturniidae).

Ecdystéroïdes dans les oeufs au cours de développement d'*Antheraea mylitta* (Lepidoptera : Saturniidae).

ASAOKA K., ROYER C., MAUCHAMP B.L.

INRA, Unité Nationale Séricicole, 25 quai J-J. Rousseau 69350 La Mulatière, France.

1992 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 27(4), 589-592. (E)

Improved method of artificial hatching using imidazole derivatives and effect of the injection of 20-hydroxyecdysone on diapause breakdown in pharate first-instar larvae in the wild silkworm, *Antheraea yamamai*.

Amélioration de l'éclosion artificielle à l'aide de dérivés imidazole et effet de l'injection de 20-hydroxyecdysone sur la levée de diapause chez les pré-larves du ver à soie sauvage *Antheraea yamamai*.

FUJISAWA T., KUMAGAI T., KUWANO E., SUZUKI K.

Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 207-214. (J,e)

Exceptional males hatched from inseminated eggs treated with hot-water immediately after oviposition by triploid female moths in the silkworm, *Bombyx mori*.

Éclosion exceptionnelle de mâles à partir d'oeufs traités à l'eau chaude immédiatement après l'oviposition d'un papillon femelle triploïde chez *Bombyx mori*.

HIROKAWA M.

Fukushima Sericultural Experiment Station, Yanagawa, Fukushima 960 07, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 335-340. (J,e)

Isolation and embryonic expression of an abdominal-A-like gene from the lepidopteran, *Manduca sexta*.

Isolement et expression embryonnaire d'un gène semblable au gène abdominal A chez *Manduca sexta*.

NAGY L. M., BOOKER R., RIDDIFORD L.M.

Dept. of Zoology, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA.

1991 *Development*, Vol. 112, 119-129. (E)

DNA polymerase-delta from the silk glands of *Bombyx mori*.

ADN polymerase-delta des glandes séricigènes de *Bombyx mori*.

NIRANJANAKUMARI S., GOPINATHAN K.P.

Dept. Microbiol. & Cell Biol., Center Genet. Engineering, Indian Inst. Sci., Bangalore 560012, India.

1992 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, 17531-17539. (E)

About 960,000 cell nuclei in the newborn silkworm *Bombyx mori*.

Environ 960 000 noyaux cellulaires chez le ver à soie *Bombyx mori* à l'éclosion.

PLOYE H., LEGAY J-M.

Laboratoire de Biométrie, U.R.A.-C.N.R.S. n°243, Université Cl. Bernard - Lyon I, 43 Bd du 11

Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

1992 *C. R. Acad. Sci. Paris*, 314, Serie III, 403-409. (F,e)

Role of mating durations on egg laying frequency of *Bombyx mori* L.

Rôle de la durée de l'accouplement sur la fréquence de ponte chez *Bombyx mori* L.

ROYCHOUDHURY N., KISHOR KUMAR C.M., BASU R., Dr. SHAMSUDDIN

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(8), 18-19. (E)

Induction of the triploid silkworm, *Bombyx mori*, by ice-water treatment applied to eggs inseminated immediately after oviposition.

Induction de ver à soie triploïde *Bombyx mori* par traitement à l'eau glacée des œufs immédiatement après la ponte.

YOKOYAMA T., AIZAWA M., OSHIKI T.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture & Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 429-435. (J,e)

Embryonic death in the eggs oviposited by a triploid female mated with a normal moth in *Bombyx mori*.

Mort embryonnaire dans les œufs pondus par une femelle triploïde de *Bombyx mori* accouplée avec un mâle normal.

YOKOYAMA T., OSHIKI T.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 370-377. (J,e)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Developmental changes in electrophoretic patterns of sericin in the silk gland of *Bombyx mori*.

Variations des profils électrophorétiques de la sérécine au cours du développement dans la glande séricigène de *Bombyx mori*.

HU W., SHIMADA T., KOBAYASHI M.

Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 236-240. (J,e)

Regulation of glycine tRNA gene expression in the posterior silk glands of the silkworm, *Bombyx mori*.

Régulation de l'expression du gène de l'ARNt glycine dans le sécréteur du ver à soie *Bombyx mori*.

TANEJA R., GOPALKRISHNAN R., GOPINATHAN K.P.

Dept. Microbiol. & Cell Biol., Ctr. Genet. Engineering, Indian Inst. Science, Bangalore 560012 India

1992 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, Vol 89, 1070-1074. (E)

Soie

Silk

On electromagnetic wave conducting via the sample of *Bombyx* cocoons (evaluating *Bombyx* cocoon characteristics).

Sur l'onde électromagnétique conduite via l'échantillon de cocons de *Bombyx* pour évaluer des caractéristiques des cocons de *Bombyx*.

ABDISATAROV B.A., MATMUSAEV U.M., REZNIK A.M.

1990 *Shelk (USSR)*, 2, 12-13. (Ru)

Studies on criteria for the control of evenness defects in fixed size reeling process.

Etudes sur les critères de contrôle des défauts de régularité lors du dévidage à titre fixe.

BAI LUN., YANG YAPING., SIMAZAKI.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 347-354. (J,e)

Caratterizzazione di fili di seta provenienti da manufatti settecenteschi bolognesi.

Characterization of silk thread from 18th century bolognese factories.

Caractérisation des fils de soie provenant de manufactures bolonaises du XVIII^e siècle.

BIANCHI SVILOKO A., MAIFRENI T.

Stazion Sperimentale per la Seta, Via G. Colombo 81, Milano, Italia.

1991 *La Seta*, Vol. XLIII N 2-3, 18-22. (I)

Effetto dell'agraffaggio sul comportamento della seta all'usura e al lavaggio.

Effet du mordantage sur le comportement à l'usure et au lavage d'un tissu de soie.

BIANCHI SVILOKOS A., MASSAFRA M.R.

Stazione Sperimentale per la Seta, Via G. Colombo 81, Milano, Italia.

1992 *La Seta*, Vol. XLIV N1-2, 7-11 (I)

A study on the silk printing with reactive dye.

Etude sur l'impression de la soie avec un colorant réactif.

CHUNG I.M., LEE Y.W., LEE K.G., SON W.K.

Rural Development Administration, Suwon, Sericulture Experiment Station, Korea Republic.

1991 *The Research Reports of the Rural Development Administration*, Vol. 33(3), 64-68. (Ko,e)

La sericina come materia prima secondaria del ciclo della seta/ The sericin as secondary raw material in the silk cycle.

La sérécine comme matière première secondaire dans le cycle de la soie.

COLONNA G.M.

Stazione Sperimentale per la Seta, Via G. Colombo, 81, Milano. Italia.

1991 *La Seta*, Vol. XLIII N1, 13-23. (I,e,f)

Dyeing of silk/synthetic fibers with azo-dyes containing a malonic acid group or a malonic ester group.

Teinture de la soie et des fibres synthétiques avec des colorants contenant un groupement acide malonique ou ester malonique.

DOHMYOU M., INOUE Y., SHIMIZU Y., KIMURA M.

Shiga Prefectural Junior College, Hikone 522, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 328-334. (J,e)

The role of water in silk reeling.

Le rôle de l'eau dans le dévidage de la soie.

DORESWAMY C., NAGESHCHANDRA B.K.

Department of Sericulture, University of Agricultural Science, G.K.V.K., Bangalore 560 065, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(8), 51-52. (E)

Fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from cocoon shells of the silkworm, *Bombyx mori* and the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

Composition en acides gras de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine des coques soyeuses des cocons du ver à soie *Bombyx mori* et du ver à soie japonais du chêne *Antheraea yamamai*.

FURUSAWA T., NARUTAKI A.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-Ku, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

1991 *Bull. of the Apparel Science Research Center*, Vol. 10, 21-25. (J,e)

Muga post cocoon technology - New dimension.

La technologie post-cocons pour la soie Muga - Nouvelle dimension.

GHOSE J., SENGUPTA A.K.

Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko 781 123, Dist.Kamrup (Assam), India.

1993 *Indian Silk*, Vol.31(9), 13-19. (E)

Studies on pre-steaming of overdried cocoons to improve the reeling performance.

Etudes sur la pré-cuisson des cocons étouffés afin d'améliorer le dévidage.

HARIRAJ G., NAIK S.V., LAKSHMIPATHAIAH B.N., NADIGER G.S.

Central Silk Technological Research Institute, B.T.M. Layout, Madiwala, Bangalore 560 008, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(7), 23-25. (E)

Effect of the spinning environment on dissolution of cocoon shell sericin.

Effet de l'environnement du filage du cocon sur la dissolution de la sérécine de la coque.

HU W-J., KOBAYASHI M.

The Chugoku National Agricultural Experiment Station, Nishi-Fukatsu, Fukuyama 721, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 272-274. (J)

Surface and mechanical properties of wild silk fibers degummed with enzymes.

Propriétés mécaniques et de surface des fibres de soies sauvages décreusées avec des enzymes.

KAWAHARA Y., NAKAJIMA S.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 460-462. (J)

Relation between the interaction parameter (between silk and alcohol containing water) and the swelling of silk.

Relation entre le paramètre d'interaction (entre la soie et l'eau alcoolisée) et le gonflement de la soie.

KITAMURA A., CHEN K., SIBAMOTO A.

Suzho Institute of Silk Textile, China.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 436-443. (J,e)

Elongation-shrinkage behavior of silk in organic solvents.

Comportement d'éirement de la soie dans des solvants organiques.

KITAMURA A., CHEN K., SIBAMOTO A., DEMURA M.

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 215-220. (J,e)

Small protein components of the cocoons in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) and *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae).

Petits composants protéiques des cocons de *Galleria mellonella* et de *Bombyx mori*.

KODRIK D.

Inst. Entomol., Czechoslovak Acad. Sci., Branisovska 31, 370 05 Ceské Budejovice, Czechoslovakia.

1992 *Acta Entomol. Bohemoslovaca*, Vol. 89(4), 269-274. (E)

Studies on control criterion of number of cocoons in supply process of newly cooked cocoons in an automatic raw silk reeling machine.

Etude sur le critère de contrôle du nombre de cocons dans le processus d'alimentation en cocons récemment cuits d'une machine automatique à dévider la soie.

LUN B., YAPING Y.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 414-420. (J,e)

Distribution of raw silk size at first feeding end point in relation to fixed size reeling process.

Distribution du titre de la soie grège au premier point d'alimentation dans un processus de dévidage à titre fixe.

LUN B., YAPING Y., SHIMAZAKI A.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 221-227. (J,e)

Preservation of quasi-fresh cocoon treated with ethylenoxide gas.

Conservation des cocons frais traités avec de l'oxyde d'éthylène gazeux.

MATSUMOTO T., SHIMIZU S., HASHIMOTO Y.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-Ku, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

1991 *Bull. of the Apparel Science Research Center*, Vol. 10, 30-33. (J,e)

Relationship between properties of cocoons and size of raw silk immediately before and after feeding ends.

Rapport entre les propriétés des cocons et le titre du fil de soie grège juste avant et après le jette-bout.

MIURA M., KIKUCHI Y., XU C., MORIKAWA H., NISHIOKA T.

Faculty of Textile Science & Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. J.*, Vol. 61(4), 306-311. (E)

The silk waste : raw material for spun silk industry.

Déchets de soie : matière première pour l'industrie du filage.

NAIK S.V., HARIRAJ G., LAKSHMIPATHIAH B.N., NADIGER G.S.

Central Silk Technological Research Institute, Bangalore 560 068, India.

1992 *Indian Silk*, Vol. 31(8), 15-17. (E)

Physical and chemical properties of mulberry, tasar and eri silk fibres.

Propriétés physiques et chimiques des fibres de soie mûrier, tasar et eri.

NEERU SALUJA, MADAN M., VASUDEVAN P.

Centre for rural development and appropriate technology, Haus Khas, New Delhi 110 016, India.

1993 *Indian Silk*, Vol. 31(9), 35-38. (E)

Characteristics of MJS yarn in relation to spinning parameters.

Caractéristiques du fil MJS liées aux paramètres de filage.

NISHIMURA T., SAKABE H., VENKATAPATHI T.M.

Cooperative Research Center, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-Ku, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

1991 *Bull. of the Apparel Science Research Center*, Vol. 10, 82-89. (E,j)

Characteristics of knot pattern appearing in the cloth woven from doupion silk.

Caractéristiques de bouchons apparaissant sur les étoffes tissées avec de la soie doupion.

NISHIOKA T., MIURA M., SHIMAZAKI A., MORIKAWA H.

Faculty of Textile Science & Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 361-369. (J,e)

Development of an antibody against a 170-kDa fragment of fibroin isolated from cocoon fibres of *Bombyx mori*.

Développement d'un anticorps contre un fragment de fibroïne de 170 kDa isolé de fibres du cocon de *Bombyx mori*.

RAJAN M.K., BALAKRISHNAN A., JAYARAMAN K.

Anna Univ., College of Technology, Centre for Biotechnology, Madras, India.

1992 *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Vol. 25(1), 37-43. (E)

Feeling and surface contact condition of woven and knitted silk cloth.

Sensation et touché d'un vêtement de soie tricoté et tissé.

SAKAGUCHI A., HAYASHI M., SHIMIZU Y.

Faculty of Textile Science & Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. J.*, Vol. 61(4), 312-320. (J,e)

Study on the distance between feeding end and the fluctuation of the size of raw silk.

Etude sur la distance entre le jettebout et la fluctuation du titre de la soie grège.

SEGI H.

Nissan Motor Co., Ltd., Mitaka-City, Tokyo. Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(5), 407-413. (J,e)

Study on the mechanical function of the size detector of an automatic silk reeling machine.

Etude sur la fonction mécanique du détecteur de titre d'une machine automatique à dévider la soie.

SEGI H.

Nissan Motor Co., Ltd, Mitaka-City, Tokyo. Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 265-271. (J,e)

Reactivity of functional amino acid residues in wild silk fibroins to monoepoxides.

Réactivité des acides aminés aux monoépoxydes dans les fibroïnes de soie sauvage.

SHIOZAKI H., TANAKA Y.

Research Institute for Polymers and Textiles, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(3), 247-256. (E)

Studies on cocoon shell constituents of *Antheraea proylei* J. - A temperate tasar species.

Etudes sur les constituents de la coque du cocon d'*Antheraea proylei* J. - Une souche tasar tempérée.

SINHA U.S.P., SINHA A.K., BAHMACHARI B.N., MAJHI S.K.

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi 834 005, India.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 63-64. (E)

Studies on commercial qualities of multivoltine hybrid raw silk, reeled on various devices in Karnataka.

Etudes sur les qualités commerciales de la soie grège d'un hybride polyvoltin, dévidée sur des machines différentes au Karnataka.

SONWALKAR T.N., ROY S., VASUMATHI B.V.

Central Silk Technological Research Institute, B.T.M. Layout, Madivala, Bangalore 68, India.

1992 *Indian J. Seric.*, Vol. 31(1), 9-16. (E,f)

Expert system for cocoon cooking by the application of analytic hierarchy process method.

Système expert pour la cuisson des cocons par l'application d'une méthode hiérarchisée analytique.

TAJIMA F., KINOSHITA H., WATASE H.

Yokohama National University, Yokohama-city, Kanagawa 240, Japan.

1992 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 61(4), 355-360. (J,e)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

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

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

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

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

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

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.
- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.
- Remerciements.
- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

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

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

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

SETOYAMA K. (1962) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

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

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

5) The typescript should contain the following features:

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

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

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

- Acknowledgements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Directeur Gérant : Dr H. BOUVIER

Dépôt légal : 4e trimestre 1992